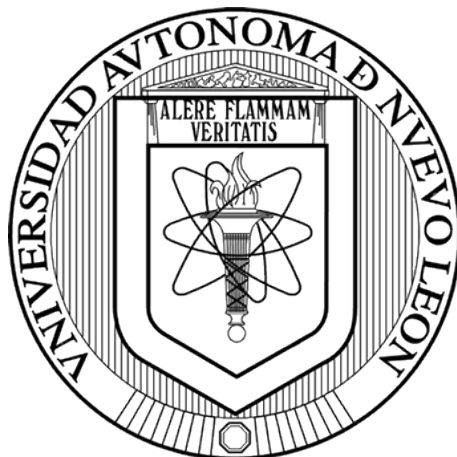


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRACCIONES
CON ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE *Argemone mexicana* L. y *Kalanchoe
daigremontiana* Raym. - Hamet & H.Perrier**

Presenta:

M.C. JOEL HORACIO ELIZONDO LUÉVANO

Como requisito para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias con Acentuación en Química de Productos Naturales

MONTERREY N.L. 2020

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE FARMACIA



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**EVALUACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRACCIONES
CON ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE *Argemone mexicana* L. y *Kalanchoe
daigremontiana* Raym. - Hamet & H.Perrier**

Presenta:

M.C. JOEL HORACIO ELIZONDO LUÉVANO

Como requisito para obtener el grado de:

Doctor en Salud y Desarrollo en los Trópicos

MONTERREY N.L. 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN (MÉXICO)

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (ESPAÑA)



**VNiVERSiDAD
DSALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

TESIS EN COTUTELA

**EVALUACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRACCIONES CON
ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE *Argemone mexicana* L. y *Kalanchoe
daigremontiana* Raym. - Hamet & H.Perrier**

Presenta:

M.C. JOEL HORACIO ELIZONDO LUÉVANO

Como requisito para obtener el grado de:

**Doctor en Ciencias con Acentuación en Química de Productos Naturales por la
Universidad Autónoma de Nuevo León**

y

Doctor en Salud y Desarrollo en los Trópicos por la Universidad de Salamanca

MONTERREY N.L. 2020

**EVALUACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRACCIONES CON
ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE *Argemone mexicana* L. y *Kalanchoe
daigremontiana* Hamet & H.Perrier**

COMITÉ DE TESIS



Director: Dr. Abelardo Chávez Montes



Secretario: Dra. Julia Verde Star



Vocal: Dra. Maria Adriana Núñez González



Vocal: Dra. Azucena del Carmen González Horta



Vocal: Dr. Eduardo Sánchez García

MONTERREY N.L. 2020

DIRECCIÓN DE TESIS



Director: Dr. Abelardo Chávez Montes

Coodirector: Dr. Antonio Muro Álvarez

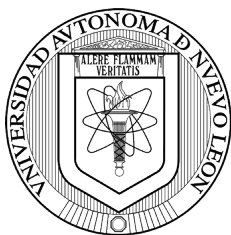


Asesor externo: Dra. Magda Elizabeth Hernández García



Asesor externo: Dra. Rocío Castro Ríos

MONTERREY N.L. 2020



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



Abelardo Chávez Montes., PhD., Profesor Titular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y Antonio Muro PhD., Catedrático del Área de Parasitología y Decano de la Facultad de Farmacia en la Universidad de Salamanca, Miembro del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (USAL – CIETUS) y del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL).

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral Titulada: “EVALUACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRACCIONES CON ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE *Argemone mexicana* (L) y *Kalanchoe daigremontiana* (Hamet & H.Perrier)”, presentada para optar a la doble titulación de Doctor en Ciencias con Acentuación en Química de Productos Naturales por la Universidad Autónoma de Nuevo León y Doctor en Salud y Desarrollo en los Trópicos por la Universidad de Salamanca, en la modalidad de tesis y por compendio de publicaciones, ha sido realizada por Joel Horacio Elizondo Luévano M.Sc., cPhD., identificado con pasaporte de nacionalidad Mexicana (G16194032) y NIE Y6314227M. En calidad de directores, consideramos que el documento reúne los requisitos necesarios, por lo que autorizamos su presentación para ser evaluado.

Fdo. Dr. Abelardo Chávez

Montes

Fdo. Dr. Antonio Muro

DEDICATORIA

Este trabajo está especialmente dedicado a mis padres y a mi familia,
quienes siempre me han apoyado en mis proyectos.

Gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS

- Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) bajo el proyecto CB176853 con el apoyo brindado a Joel H. Elizondo Luevano (No.Reg. 418935) y a la Fundación USAL – Banco Santander y el Instituto de Salud Carlos III de España por el apoyo brindado
- Un especial agradecimiento a mi amigo el Dr. Abelardo Chávez Montes y al comité de tesis por su apoyo en la dirección de la tesis y por creer en el proyecto.
- Un agradecimiento especial a los doctores Julio López y Antonio Muro por su tutela, asesoramiento y por permitirme realizar una estancia en el CIETUS.
- A los doctores Gustavo Ponce García y Roberto Mercado Hernández de la UANL y a los doctores Javier Burguillo y Juan Hernández Goenaga de la USAL por su asesoramiento estadístico. A Dr. Ramiro Quintanilla, Dra. Verónica, Dra. Esther Del Olmo y Dra. Rocío Castro por su asesoramiento químico y a Dra. Belén, Dr. Pedro por su asesoramiento técnico.
- Un agradecimiento a mis compañeros de laboratorio en la UANL: Ale Pacheco, Denisse, Oscar, David Gilberto, David Misael, David Alejandro, Héctor, Karen, Michell, Emily, Misael, Nancy, Raymundo, Homero. Y en la USAL: Juan, Ana, Oscar, Begoña, Isabel, Martha.
- A mis amigos Paloma Amarillas, Zoé Morreeuw, Alx, Gustavo, Brenda Soto, Brenda Pérez, Erica, Daniela, Diana, Castro, Sara, Álvaro, Oscar, Erlijne y Horacio.
- A Dr. Eduardo García, Dr. Ezequiel Viveros y M.C. Sergio García, a las doctoras Catalina Rivas y Catalina Leos, por su apoyo durante la tesis.

LUGAR DE TRABAJO



Laboratorio de química analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad Autónoma de Nuevo León.



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular, Área de Parasitología. Universidad de Salamanca (USAL), Salamanca, España.



Laboratorio de Biología Celular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS. Monterrey, México.



Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca. Salamanca, España



Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (USAL – CIETUS).

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pagina
1.	Taxonomía de <i>Argemone mexicana</i> .	4
2.	Taxonomía de <i>Kalanchoe daigremontiana</i> .	5
3.	Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	7
4.	Ciclo de vida de <i>Trichomonas vaginalis</i>	9
5.	Ciclo de vida de <i>Strongyloides stercoralis</i>	11
6.	Ciclo de vida de <i>Schistosoma mansoni</i>	13
7.	Representación de las NP.	18
8.	Órgano diana de liberación y estructura de los polímeros Eudragit®	20
9.	Representación del aparato de Baermann para la recuperación de larvas.	27
10.	Esquema de la técnica de nanoprecipitación.	39
11.	Cinética de crecimiento de <i>E. histolytica</i> y <i>T. vaginalis</i> .	42
12.	Cromatografía de capa fina (TLC) de los extractos y berberina (Ber).	46
13.	Cromatogramas obtenidos para AmT, AmH y Ber.	47
14.	Cromatogramas y espectros de masas obtenidos para AmH4. Fragmentograma LC-MS / MS y espectros MS / MS obtenidos para berberina y jatrorrizina.	49
15.	Espectros ¹ H-NMR y ¹³ C-NMR de Ber, AmH4 y AmH.	50
16.	Estructuras en <i>in-silico</i> (3D) del acoplamiento molecular de berberina y la subunidad β-tubulina.	55
17.	Formulaciones de las NP.	56
18.	Curva de calibración de Berberina en metanol.	58
19.	Morfología de las nanopartículas poliméricas cargadas con berberina vía SEM	60

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pagina
1.	Sistemas acarreadores de fármacos y moléculas encapsuladas.	18
2.	Análisis fitoquímico básico del extracto crudo de hojas y tallos de <i>A. mexicana</i> y <i>K. daigremontiana</i> .	41
3.	Concentración inhibitoria media (IC ₅₀) (media \pm DE) de los extractos crudos de <i>A. mexicana</i> y <i>K. daigremontiana</i> contra <i>E. histolytica</i> , <i>T. vaginalis</i> y <i>S. venezuelensis</i> .	43
4.	Efecto los extractos crudos de hoja y tallo de <i>A. mexicana</i> y <i>K. daigremontiana</i> sobre la motilidad media de 9 parejas adultos de <i>S. mansoni</i> por concentración, en cultivo a las 24, 48, 72 y 92 horas comparados con praziquantel	44
5.	Concentración inhibitoria media (IC ₅₀ ; media \pm DE) de las fracciones de <i>A. mexicana</i> frente <i>E. histolytica</i> , <i>T. vaginalis</i> y <i>S. venezuelensis</i> .	45
6.	Actividad de Ber contra <i>S. mansoni</i> adultos en cultivo.	51
7.	Porcentaje de hemólisis (% media \pm DE) causada por los extractos de hojas y tallos de <i>A. mexicana</i> y <i>K. daigremontiana</i> .	52
8.	Porcentajes (media \pm DE) de hemólisis y citoprotección del extracto de <i>A. mexicana</i> (Am), la fracción AmH4 y berberina (Ber).	53
9.	Porcentaje de hemólisis (% media \pm DE) causada por los formulados de NP con polímeros EPO, E100, L100 y L100-55.	57
10.	Determinación de tamaño (nm), polidispersidad (PDI) y porcentaje de eficiencia de encapsulación (%) de nanopartículas cargadas con berberina idóneos con polímeros EPO, E100, L100 y L100-55.	59
11.	Composición del medio PEHPS	85

ÍNDICE DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	PLANTAS MEDICINALES	2
1.1.1	<i>Argemone mexicana</i> (Amapola mexicana, cardosanto o adormidera)	3
1.1.2	<i>Kalanchoe daigremontiana</i> (Aranto)	4
1.2	PARÁSITOS	6
1.2.1	<i>Entamoeba histolytica</i>	6
1.2.2	<i>Trichomonas vaginalis</i>	8
1.2.3	<i>Strongyloides stercoralis</i>	9
1.2.4	<i>Schistosoma mansoni</i>	11
1.3	TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LAS PARASITOSIS	13
1.3.1.1	Antiparasitarios	14
1.3.1.2	Efectos adversos de los antiparasitarios	15
1.3.1.3	Resistencia a los antiparasitarios	16
1.4	SISTEMAS TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS	17
1.4.1.1	Nanopartículas poliméricas como vectores farmacéuticos	18
1.4.1.2	Nanopartículas para la administración de fármacos antiparasitarios	19
1.4.1.3	Copolímeros derivados del poli-metacrilato (Eudragit®)	20
1.5	ACOPLAMIENTO MOLECULAR	21
2	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA, JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
2.1	JUSTIFICACIÓN	23
2.2	HIPÓTESIS	23
2.3	OBJETIVOS	24
2.3.1	OBJETIVO GENERAL	24
2.3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3	MATERIAL Y MÉTODOS	25
3.1	REACTIVOS	25
3.2	PARÁSITOS	25
3.3	PLANTAS MEDICINALES	25
3.4	CULTIVOS AXÉNICOS DE LAS CEPAS	26
3.5	EXTRACCIÓN METANOLICA DE PLANTAS MEDICINALES	28
3.5.1	Rendimiento	29
3.6	PRUEBAS FITOQUÍMICAS BÁSICAS	29
3.6.1	Prueba de Liebermann-Burchard	30
3.6.2	Prueba de Salkowski	30
3.6.3	Prueba de Baljet	30
3.6.4	Prueba de Dragendorff	30
3.6.5	Prueba para cumarinas	30
3.6.6	Prueba de permanganato de potasio	31
3.6.7	Prueba de hidróxido de sodio	31
3.6.8	Prueba de cloruro férrico	31
3.6.9	Prueba de bicarbonato de sodio	31
3.6.10	Prueba de Shinoda	31
3.6.11	Prueba de 2,4-dinitrofenilhidrazina	31
3.6.12	Prueba de la antrona	32
3.7	PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	32
3.7.1	Actividad contra <i>E. histolytica</i> y <i>T. vaginalis</i>	32
3.7.2	Actividad contra <i>S. venezuelensis</i> y <i>S. mansoni</i>	33
3.8	FRACCIONAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITO ACTIVO	34
3.8.1	Fraccionamiento con solventes	34
3.8.2	Fraccionamiento por métodos cromatográficos	34
3.8.3	Cromatografía en capa fina (TLC)	35
3.8.4	Análisis Espectroscópico	35
3.9	PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD Y CITOPROTECCIÓN	36

3.9.1	Citotoxicidad mediante la prueba de hemólisis	36
3.9.2	Bioensayo de Citoprotección mediante el método de AAPH.....	37
3.10	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE UNIÓN MOLECULAR (<i>Molecular Docking</i>).....	38
3.11	NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	38
3.12	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40
4	RESULTADOS.....	41
4.1	PRUEBAS FITOQUÍMICAS	41
4.2	CINÉTICAS DE CRECIMIENTO	42
4.3	ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS CRUDOS	43
4.4	ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS FRACCIONES	45
4.5	IDENTIFICACION DEL COMPONENTE ACTIVO	46
4.5.1	IDENTIFICACION POR TLC	46
4.5.2	IDENTIFICACION POR METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS	47
4.6	ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL COMPONENTE ACTIVO	51
4.7	EVALUACIÓN CITOTÓXICA Y CITOPROTECTORA	52
4.8	ANALISIS BIOINFORMÁTICO	54
4.9	PREPARACION DE LAS NP	56
4.10	EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS	57
4.11	ENCAPSULACIÓN DEL COMPUESTO ACTIVO	58
5	DISCUSIÓN	61
5.1	Rendimiento y estudio de compuestos	62
5.2	Eficacia de los extractos	63
5.3	Toxicidad	68
5.4	Estudios de acoplamiento.....	69
5.5	Formulaciones	70
6	CONCLUSIONES	74
7	PERSPECTIVAS	75
8	REFERENCIAS.....	76
9	ANEXOS	85
9.1	MEDIOS DE CULTIVO.....	85
9.1.1	Medio PEHPS	85
9.1.2	Extracto hígado-páncreas	85
9.1.3	Suero bovino	86
9.1.4	Medio de cultivo RPMI – 1640 SFB 10 %	86
9.2	RESUMEN BIOGRÁFICO	87
9.3	CONGRESOS	88
9.4	ESTANCIAS DE INVESTIGACION.....	101
9.5	PUBLICACIONES	104

RESUMEN

Las plantas poseen múltiples componentes químicos los cuales se pueden denominar como activos porque provocan diversos efectos o respuestas en el organismo. Las parasitosis representan un grave problema de salud pública, principalmente en regiones tropicales y subtropicales. Desde el punto de vista farmacéutico, el uso de sistemas de liberación prolongada son un parámetro clave en su interacción con sistemas biológicos. El presente estudio tuvo como objetivo investigar los efectos antiparasitarios de extractos metanólicos y sus fracciones, de *Argemone mexicana* y *Kalanchoe daigremontiana* (Los parásitos de importancia clínica modelo estudiados fueron *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Strongyloides venezuelensis* y *Schistosoma mansoni*), así como de su principal componente activo, en experimentos *in-vitro*. También, se investigó la actividad citotóxica y citoprotectora de los extractos, fracciones y molécula activa en eritrocitos humanos. Se prepararon extractos metanólicos de hojas y tallos secos de *A. mexicana* y *K. daigremontiana*, se caracterizaron fitoquímicamente y se realizó fraccionamiento con solventes de distinta polaridad. Posteriormente, se determinó el porcentaje de viabilidad y la concentración inhibitoria media (IC₅₀) siendo la fracción metanólica de hoja la más efectiva con IC₅₀ de 39, 56 y 15 µg/mL sobre *E. histolytica*, *T. vaginalis* y *S. venezuelensis* respectivamente, para *S. mansoni* fue letal a 50 µg/mL. La fracción activa se analizó por cromatografía de líquidos (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (MS) y se identificó el alcaloide berberina (Ber) el cual presentó IC₅₀ de 3.3, 1.9, 5.8 y 1.7 respectivamente sobre *E. histolytica*, *T. vaginalis*, *S. venezuelensis* y *S. mansoni*. Finalmente, se determinó la capacidad citotóxica y citoprotectora mediante la técnica de hemólisis en eritrocitos. Con el objeto de nanoencapsular la molécula activa y obtener nanopartículas poliméricas (NP) con tamaño ≤ 200 nm e índice de polidispersidad (PDI) ≤ 0.2 y sin efecto citotóxico. Se utilizaron polímeros Eudragit EPO, E100, L100 y L100-55 los cuales arrojaron tamaños de partícula de 150, 200, 72.2 y 168 nm con un porcentaje de encapsulación de Ber del 72.3, 38.4, 47.1 y 17.6 respectivamente.

ABSTRACT

Plants have multiple chemical components which can be called active because they produce diverse effects or responses in the organism. Parasitism represents a serious public health problem, mainly in tropical and subtropical regions. From a pharmaceutical point of view, the use of extended-release systems is a critical parameter in their interaction with biological systems. The present study aimed to investigate the antiparasitic effects of methanolic extracts and their fractions, of *Argemone mexicana* and *Kalanchoe daigremontiana* (The parasites of clinical importance model studied were *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Strongyloides venezuelensis*, and *Schistosoma mansoni*), as well as their main active component, in in-vitro experiments. Also, it was investigated the cytotoxic and cytoprotective activity of the extracts, fractions, and active molecule in human erythrocytes. There were prepared methanolic extracts from leaves and dry stems of *A. mexicana* and *K. daigremontiana*, they were phytochemically characterized and fractionation was carried out with solvents of different polarity. Later, it was determined the percentage of viability and the average inhibitory concentration (IC₅₀) being the methanolic leaf fraction the most effective with IC₅₀ of 39, 56, and 15 µg/mL over *E. histolytica*, *T. vaginalis*, and *S. venezuelensis* respectively, for *S. mansoni* it was lethal at 50 µg/mL. The active fraction was analyzed by liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry (MS) and the berberine alkaloid (Ber) was identified which presented IC₅₀ of 3.3, 1.9, 5.8, and 1.7 respectively on *E. histolytica*, *T. vaginalis*, *S. venezuelensis*, and *S. mansoni*. Finally, it was determined the cytotoxic and cytoprotective capacity using the technique of hemolysis in erythrocytes. To nanoencapsulate the active molecule and obtain polymeric nanoparticles (NP) with a size ≤ 200 nm and polydispersity index (PDI) ≤ 0.2 and without cytotoxic effect. Eudragit EPO, E100, L100, and L100-55 polymers were used, which yielded particle sizes of 150, 200, 72.2, and 168 nm with a Ber encapsulation percentage of 72.3, 38.4, 47.1, and 17.6, respectively.

1 INTRODUCCIÓN

Los productos naturales han desempeñado un papel importante en todo el mundo en el tratamiento y la prevención enfermedades, ya que ofrecen una amplia diversidad de componentes, los cuales pueden servir como fármacos, además de revelar nuevos mecanismos de acción para el control de dichas enfermedades (Chin et al., 2006; Ghorbani et al., 2006). En los últimos años, las plantas medicinales y sus derivados han despertado mucho interés, por su potencial en el tratamiento de enfermedades inclusive las infecciosas. Se han recogido numerosas plantas utilizadas en la terapéutica popular para contra las enfermedades infecciosas que están pendientes de estudios científicos detallados (Appalasamy et al., 2014). Amplios sectores de la población de los países en desarrollo dependen de las plantas medicinales para el abastecimiento de la salud (Davoodi & Abbasi-Maleki, 2018). El uso de plantas medicinales ha estado presente desde la época prehispánica en México, donde se puede encontrar la descripción del uso medicinal de más de 150 plantas mexicanas utilizadas desde esa época (Nigenda, Mora-Flores, Aldama-López, & Orozco-Núñez, 2001). Las plantas pueden suministrarse de diferentes formas como lo son cápsulas, comprimidos, crema, infusión, jarabe, ungüento, etc. Actualmente se han mejorado las terapias farmacológicas la cual radica no solo en la búsqueda de nuevos activos sino en mejorar la forma en que se presentan los principios activos, destacan de los llamados sistemas de liberación como acarreadores submicroscópicos de fármacos tales como las nanopartículas poliméricas (NP) (Sester et al., 2020). Las NP destacan por ser un sistema de liberación controlada de fármacos que poseen dos características: capacidad de llegar a su blanco terapéutico y capacidad de liberar el activo de manera controlada (Froiiio et al., 2019).

Las enfermedades infecciosas son una importante causa de enfermedad en el mundo (Roth et al., 2018). En 2017, las enfermedades transmisibles fueron responsables de 8,1 millones de muertes en el mundo un 19% del total de las muertes (GBD 2017 Causes of Death

Collaborators). También fueron responsables del 28% (440 millones de personas) de la carga de enfermedad por discapacidad en el mundo (DALYs: Disability Adjusted Life Years) y de un 5% (45 millones de personas) de años vividos con discapacidad (YLDs: Years Lived With Disability) estos datos de acuerdo con el Estudio de Carga de Enfermedad Global (GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators). En los estudios de carga de enfermedad en el mundo (GBD: Global Burden Disease Study) las enfermedades parasitarias se incluyen en el grupo de las enfermedades tropicales olvidadas (NTD: Neglected Tropical Diseases), que cursan con diarrea y enfermedades de transmisión sexual. Las enfermedades causadas por protozoos (malaria, tricomonosis, amebosis, babesiosis o giardosis) y helmintos (esquistosomosis, nematodosis intestinales, estrongiloidosis, toxocariosis, anisakirosis y triquinosis) se concentran particularmente en zonas en desarrollo y con alta correlación con la pobreza (Kyu et al., 2018). Las enfermedades causadas por virus, bacterias y parásitos plantean retos relacionados con el desarrollo de tratamientos en las que el arsenal terapéutico es muy reducido e ineficaz, frente al fenómeno creciente de resistencia a los antimicrobianos y antiparasitarios (GBD 2017 DALYs and HALE Collaborators). Las parasitosis hacen referencia a la infección por organismos que viven temporal o permanentemente en un huésped, ocasionando una enfermedad parasitaria causada por alguno de los siguientes grupos: protozoos, helmintos o los ectoparásitos. Las enfermedades parasitarias constituyen un importante problema de salud pública, siendo consideradas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las principales causas de morbilidad a nivel mundial (Kucik, Martin, & Sortor, 2004).

1.1 PLANTAS MEDICINALES

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde la prehistoria. Las plantas medicinales han sido el principal e incluso el único recurso que disponían los sanadores. Esto hizo que se profundizara en el uso de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y que se ampliara la experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraen. Los tratamientos basados en plantas medicinales ayudan en las necesidades de la salud en la mayoría de la población en los países en desarrollo, donde el acceso a la atención médica y a la medicina convencional está limitado por factores económicos y culturales (Balasubramanian, 1997; Correa, 2002). Con frecuencia es el único tratamiento al que

pueden acceder las poblaciones pobres y las comunidades remotas, en un contexto de pobreza persistente y marginalidad (Hirst et al., 1996; Khur, 2000) y, en especial, en vista de los altos precios de los medicamentos patentados (Kettler, 2002). Los tratamientos basados en plantas podrían, en un futuro, adquirir mayor relevancia en los países en desarrollo. La búsqueda de productos naturales para tratamientos menos tóxicos es de vital importancia (Phillipson J.D., 1994). El interés por los productos naturales y sus aplicaciones en la industria farmacéutica en su búsqueda de nuevos medicamentos más eficientes ha aumentado exponencialmente (Butler, 2004). El 30 % de los fármacos presentes en la farmacopea actual proceden o se han sintetizado a partir de productos vegetales (Newman y Cragg, 2007), por lo que las plantas son una fuente importante para la producción de medicamentos. Todas las plantas contienen familias de compuestos relacionados, los cuales son metabolitos secundarios, que interaccionan y dan como resultado efectos biológicos (Heber, 2007; Sarker et al., 2006). Dichos metabolitos secundarios se desprenden del metabolismo primario de las plantas y han llegado a un primer plano de interés debido a su variada actividad biológica. Estas sustancias comprenden más de 30.000 compuestos diferentes identificados hasta ahora y los cuales se han clasificado en diferentes grupos, entre los principales se encuentran: alcaloides, flavonoides, triterpenos, saponinas, fitoesteroles o sus precursores (Kristo et al., 2001; Urech et al., 2005; Brieskorn et al., 1974).

1.1.1 *Argemone mexicana* (Amapola mexicana, cardosanto o adormidera)

Argemone mexicana (*A. spinosa* Gaterau., *A. spinosa* Moench., *A. vulgaris* Spach., *Echtrus mexicanus* (L.) Nieuwl., *Papaver mexicanum* (L.) E.H.L.Krause (CONABIO, 2009) es una especie de plantas perteneciente al género *Argemone* (*Papaveraceae*), de distribución americana (Fig. 1). Es una planta anual con tallo espinoso, hojas sésiles, que miden hasta 20 cm de longitud, son espinosas, poseen flores grandes de 7 cm de diámetro, rodeadas de algunas hojas reducidas y sésiles, pétalos amarillos, fruto capsular, produce semillas en grandes cantidades (Brahmachari, Gorai, & Roy, 2013b). Se encuentra en áreas abiertas al cultivo y terrenos baldíos. Su época de floración es entre febrero - abril. Entre sus usos se encuentra la producción de polen, extracción de aceite para la elaboración de jabón. En la medicina popular es empleado como antiinflamatorio y posee propiedades antibióticas. También se usa para problemas oculares, pulmonares, digestivos, dérmicos. Se ha utilizado como antidiarreico, analgésico, cicatrizante, antipalúdico y anticonvulsivo (Sharma, Malhotra, Bhatia, & Rathee, 1999). Entre sus

componentes principales se encuentran alcaloides bencilisquinolínicos como berberina, benzofenantridinas como reticulina y sanguinarina (Sharanappa & Vidyasagar, 2014). Aminoácidos como cisteína y fenilalanina, algunos flavonoides como quercetina, quercitrina mexitina entre otros compuestos como esteroides o fenoles (Chang, Chang, Khalil, Hsieh, & Wu, 2003). La sanguinarina y la berberina han mostrado actividad contra células cancerosas de cáncer de mama, vejiga, colon y piel (Meléndez González, 2013).

Reino: *Plantae*
 División: *Magnoliophyta*
 Clase: *Magnoliopsida*
 Subclase: *Magnoliidae*
 Orden: *Papaverales*
 Familia: *Papaveraceae*
 Subfamilia: *Papaveroideae*
 Tribu: *Papavereae*
 Género: *Argemone*
 Especie: *Argemone mexicana*
 Linneo 1753



Figura 1. Taxonomía de *Argemone mexicana* detalle del tallo hojas y flor (Ortiz, 2016).

1.1.2 *Kalanchoe daigremontiana* (Aranto)

Kalanchoe daigremontiana es una planta fanerógama perenne perteneciente a la familia *Crassulaceae* (Fig. 2). Es de uso ornamental en México, aunque puede comportarse como invasora, ya que puede integrarse a la vegetación autóctona fácilmente. Es endémica de Madagascar y puede producir brotes de nuevas plántulas a lo largo del margen de sus hojas, que se desprenden y emiten raíces fácilmente al caer al suelo. Posee tallo erecto, de 1 m de altura, hojas carnosas, oblongo-lanceoladas que pueden alcanzar los 15 - 20 cm de largo y unos 4 - 5 cm de ancho (Fürer, Simões-Wüst, Von Mandach, Hamburger, & Potterat, 2016). Las plantas adultas desarrollan raíces laterales, alcanzando los 10 - 15 cm del suelo. En época de floración, el tallo principal se alarga verticalmente hasta 30 cm en un par de días, desarrollando una inflorescencia terminal con pequeñas flores acampanadas de color rosa (Milad, 2014). Las

plantas del género *Kalanchoe* tienen muchas aplicaciones medicinales: En Puebla (México) se utilizaba como antipirético y para combatir afecciones respiratorias. A partir de las hojas, en la medicina popular, algunos extractos de especies del género *Kalanchoe* se utilizan para tratar infecciones, reumatismos e inflamaciones (Muñoz et al., 2000).

Entre los componentes principales se encuentran el ácido *p*-hidroxibenzoico, cafeico, cumárico, ferúlico y sirínico, los flavonoides diarabinósido de quercetol, glucósido de kaempferol; y los ácidos; los triterpenos alfa y beta-amirina, componentes acetatos, briofolona, briofinol, 18-alfa-oleanona y taraxasterol y componentes esteroides como briofilol, 24-etil-25-hidroxi-colesterol y beta-sitosterol y un glucósido cardíaco llamado daigremontianina (Milad, 2014). Algunos glucósidos de esta planta la daigremontianina y bersaldegenina 1,3,5-ortoacetato han demostrado tener efectos sedantes e inmunosupresores. A altas dosis tiene un efecto creciente sobre el sistema nervioso central, además de tener un fuerte efecto inotrópico positivo asociado a otros glucósidos cardíacos. También se conoce que estas plantas cocidas con poca agua y aplicadas en forma de cataplasma sirve para tratar lesiones dermatológicas (Puertas Mejía, Tobón Gallego, & Arango, 2014).

Reino: *Plantae*
 División: *Tracheobionta*
 Clase: *Magnoliophyta*
 Subclase: *Rosidae*
 Orden: *Saxifragales*
 Familia: *Crassulaceae*
 Sección: *Bryophyllum*
 Género: *Kalanchoe*
 Especie: *K. daigremontiana*
 Raym.- Hamet &
 H.Perrier 1934



Figura 2. Taxonomía y detalle del tallo, hojas y flores de *Kalanchoe daigremontiana* Raym.- Hamet & H. Perrier (Fernandes et al., 2019).

1.2 PARÁSITOS

Los parásitos son una importante causa de enfermedades humanas en todo el mundo, es importante mencionar que las enfermedades causadas por parásitos constituyen un problema de salud pública cosmopolita, ya que disminuyen la calidad de vida de las personas infectadas (Robertson, 2018). Teniendo en cuenta la importancia de las diferentes parasitosis estructuramos este capítulo de la tesis en cuatro apartados. En el primero se abordará el estudio de la amebosis, enfermedad parasitaria con una distribución global. En el segundo bloque revisaremos la tricomonosis, infección de transmisión sexual caracterizada por la infección del aparato genital del humano. En tercer lugar, describiremos la estrongiloidiasis, infección de las regiones tropicales y subtropicales que puede dar lugar a una enfermedad grave y difundida, en particular entre las personas inmunodeprimidas. En cuarto lugar, la esquistosomosis, también conocida como bilharziasis, enfermedad causada por trematodos pertenecientes al género *Schistosoma* transmitida por penetración a través de la piel de cercarias emitidas por moluscos terrestres.

1.2.1 *Entamoeba histolytica*

Parásito protozoario con una distribución global causante de la amebosis. Perteneciente al filo *Amoebozoa*, junto con varias otras *Entamoeba spp.* que son capaces de infectar a los humanos. Se considera que *E. histolytica* es el único patógeno humano definitivo del género, estimaciones sugieren que, a finales del siglo XX, el 10 % de la población mundial sufría esta infección e indican que es la segunda causa de muerte por enfermedades parasitarias en el mundo (Stanley, 2003). Es considerado un importante problema en países en vía de desarrollo (Bharti, Singh, Naqvi, & Azam, 2006).

Alrededor de 500 millones de personas en el mundo están infectados por *E. histolytica*, aunque sólo un 10% presentan síntomas, se calcula que mueren anualmente entre 40,000 – 100,000 personas como consecuencia de esta enfermedad. El reservorio principal de la enfermedad es el hombre (Guerrant, 2011). La forma infectiva habitual son los quistes, pero la transmisión es diversa: consumo de agua contaminada; ingesta de alimentos crudos o mal cocinados en contacto con aguas negras; manipuladores de alimentos y contactos sexuales. Desafortunadamente, las técnicas de laboratorio que se utilizan habitualmente en sujetos sintomáticos y portadores no realizan la identificación de especie. (Verweij & Stensvold. 2014). La amebosis se encuentra entre las primeras 15 causas de muerte en México (Ximénez, Morán,

Ramos, & Ramiro, 2007). Una proporción de personas infectadas desarrollan la enfermedad invasiva intestinal (ej. colitis intestinal) o extraintestinal (ej. absceso hepático) atribuibles a *E. histolytica* (Epidemiología SS, 2013).

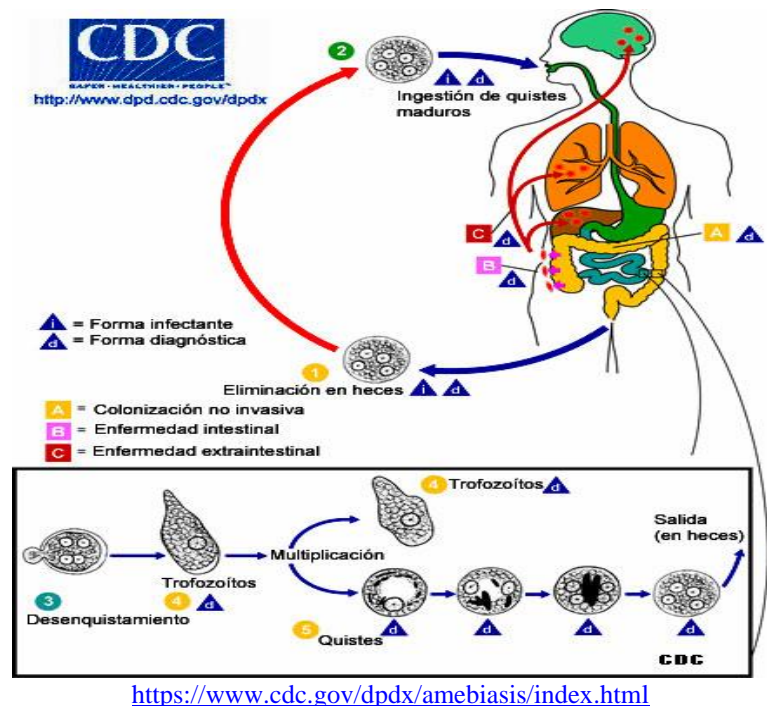


Figura 3. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* (CDC, 2020).

El trofozoíto, el cual es la vegetativa invasiva, mide 15 - 40 μm de diámetro, residen en el colon en un ambiente anaeróbico, posee forma alargada, núcleo con endosoma central y cromatina periférica fina, distribuida regularmente no disponen de mitocondrias y obtienen la energía por fermentación. Posee movilidad direccional-progresiva, a través de pseudópodos. Contiene el motor de actina/miosina, el cual impulsa a la ameba hacia adelante este se encuentra en su extremo posterior el cual se le llama uroide (Pérez-arellano & Carranza-rodríguez, 2010) El quiste es esférico (15 μm). Presentan 4 núcleos, cuerpos cromatoidales de bordes curvos y una masa de glucógeno cuando son inmaduros. Los quistes y trofozoítos son eliminados en las heces fecales (Fig. 3). Se transmite por agua y alimentos contaminados con quistes. Entre la sintomatología que se presenta es la pérdida de peso, dolor abdominal, disentería, heces sanguinolentas y fiebre. Si no hay atención médica los trofozoítos pueden invadir además del intestino grueso, otros órganos como el hígado, cerebro, pulmones y en casos graves puede

causar la muerte del hospedador (Guerrant, 2011). A modo de control, es importante extremar las medidas higiénicas en instituciones cerradas y manipuladores de alimentos. En áreas endémicas deben utilizarse medidas colectivas como evitar la contaminación fecal del agua y los alimentos e incrementar la educación sanitaria. Individualmente deben diagnosticarse rápidamente los casos de enfermedad y utilizar un tratamiento eficaz. En áreas no endémicas está indicada la detección y tratamiento de portadores asintomáticos (Pérez-arellano & Carranza-rodríguez, 2010).

1.2.2 *Trichomonas vaginalis*

Protozoo unicelular flagelado, actualmente incluido en el *phylum Parabasalia*, un grupo de organismos flagelados microaerófilos, se ha asociado con secuelas graves, las más notables de las cuales son la prematuridad, el bajo peso al nacer y el aumento de la transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana (Wendel & Workowski, 2007). Se le ubica en el tracto urogenital del ser humano. Se reconocen dos subtipos, I y II, el segundo predominante en México (Johnston & Mabey, 2008). La tricomonosis es la enfermedad de transmisión sexual (ETS) no viral más frecuente, además, aunque *T. vaginalis* puede sobrevivir en fómites, sólo se transmite por contacto sexual. La prevalencia exacta de la infección por *T. vaginalis* es difícil de conocer, ya que los datos varían atendiendo al método de estudio, área geográfica, tipo de población estudiada y edad (Johnston & Mabey, 2008). Si se presentan síntomas, aparecen entre 5 y 28 días después de la infección. Los síntomas en las mujeres incluyen, secreción vaginal amarillenta, molestia durante las relaciones sexuales, dolor al orinar, picazón en la vagina (Wendel & Workowski, 2007).

T. vaginalis se presenta como trofozoíto, aerotolerante anaeróbico amitochondriado de forma ovoide o piriforme que mide de 7-30 μm de longitud y de 5-15 μm de ancho (Di, 2014). El trofozoíto se caracteriza por presentar cuatro flagelos dispuestos de dos en dos en la parte anterior y un flagelo recurrente que forma la membrana ondulante (Fig. 4), que no llega a la parte posterior del cuerpo (Mundodi, Kucknoor, Chang, & Alderete, 2006). Se reproduce por división binaria, y no se han identificado formas de resistencia. La quitina asociada a estructuras de superficie le permite sobrevivir en condiciones ácidas (pH 4.0-4.5), experimentalmente se han detectado pseudoquistes (Alderete, Benchimol, Lehker, & Crouch, 2002). Posee forma oval o

piriforme, tiene cuatro flagelos anteriores libres y un quinto que corre posteriormente, formando una membrana ondulante, asociado a una estructura denominada costa. Posee un gran núcleo, aparato parabasal, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, axostilo central y costa. Se han observado vacuolas, gránulos y, con menor frecuencia, bacterias, leucocitos y eritrocitos en citoplasma (Mundodi et al., 2006). La prevención de la tricomonosis es similar a la empleada con otras ETS, siendo especialmente eficaz el uso de métodos de barrera.

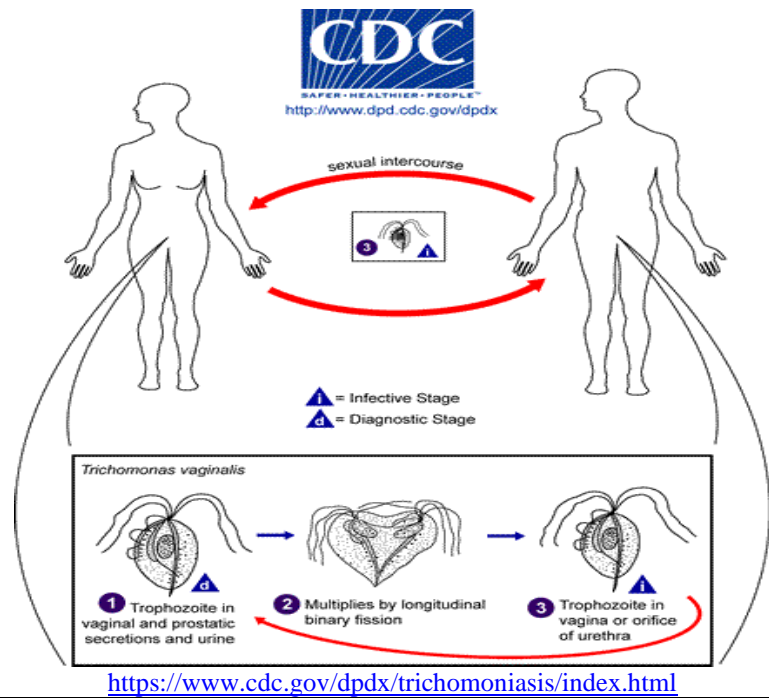


Figura 4. Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis* (CDC, 2020).

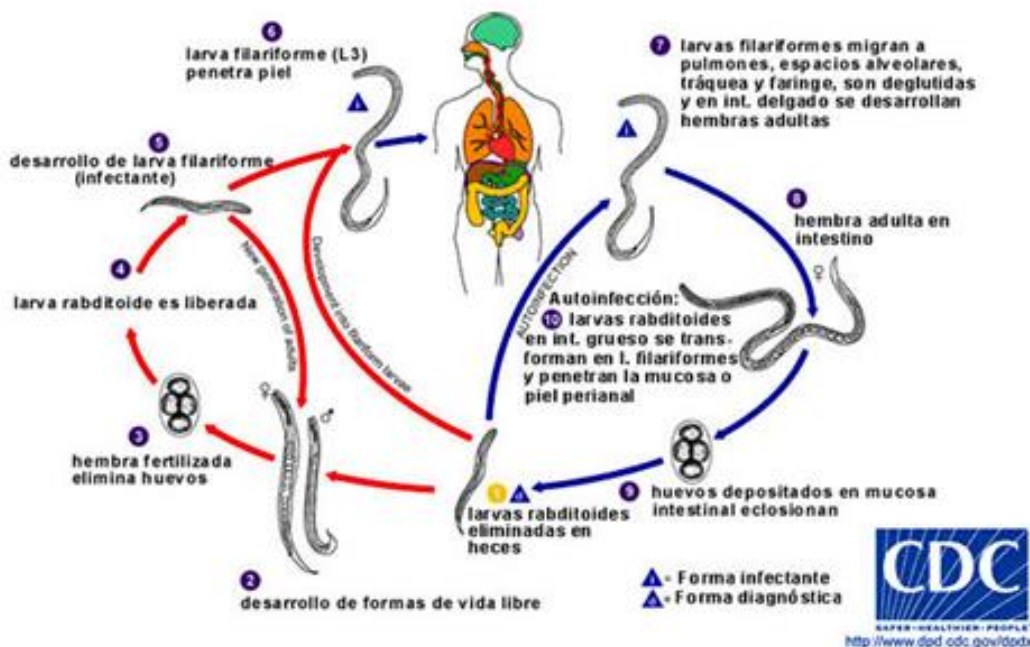
1.2.3 *Strongyloides stercoralis*

Strongyloides stercoralis, es un nematodo que provoca la estrongiloidosis la cual es una geohelmintosis, *S. stercoralis* es capaz de desarrollarse en dos ecosistemas, uno de vida libre y otro en el ser humano (Pérez-arellano & Bolaños-rivero, 2010). La estrongiloidosis es causada principalmente por *S. stercoralis*, aunque se han descrito infecciones por *S. fuelleborni* y por *S. fuelleborni kellyi* en África y Papua Nueva Guinea respectivamente (King & Mascie-Taylor, 2004). Los helmintos a nivel mundial son causantes de distintas afecciones

especialmente en países en desarrollo y están estrechamente ligadas a la pobreza y a los malos usos de las medidas higiénico-sanitarias. También las condiciones ecológicas favorecen la persistencia de los parásitos. Se estima que más de dos mil millones de individuos en el mundo albergan por lo menos una especie de geo-helminto (FAO/WHO, 2014).

La estimación global según las OMS (Organización Mundial de la Salud) es de hasta 50 - 100 millones de personas, presentando focos de alta prevalencia en más de 70 países (Ruano, Martín, Pardo, López-Abán, & Alvarez Muro, 2005). Su distribución es cosmopolita, principalmente en zonas tropicales y subtropicales, en América Latina, islas del Caribe, el Sureste Asiático, África Tropical esta enfermedad es muy prevalente, sin embargo, existen zonas endémicas en algunas regiones europeas como Rumanía, norte de Italia y este de España. (Siddiqui & Berk, 2001). La estrongiloidosis crónica que es levemente sintomática y pueden aparecer signos pulmonares y gastrointestinales. En situaciones de inmunocompromiso o tratamiento con inmunosupresores se puede disparar la multiplicación y diseminación de larvas infectantes dando el síndrome de hiperinfección o la estrongiloidosis diseminada con alto número de fallecimientos, hasta el 87 %, el tratamiento se realiza con ivermectina o albendazol (Vadlamudi, Chi, & Krishnaswamy, 2006).

La vía de acceso es a través de la piel en contacto con tierra u otros materiales contaminados (Viney, 2017). En comparación con la mayoría de los demás nematodos parásitos, el ciclo de vida del *Strongyloides* es inusual porque tiene dos generaciones adultas, una en el huésped y otra en el exterior (Fig. 5). La vida parásita es ejercida por la hembra dentro en la mucosa intestinal en ausencia del macho y produce huevos fértiles mediante partenogénesis (Viney, 2017). Las hembras parásitas producen huevos que son, genéticamente, macho y hembra. Estos huevos, o los L1 que nacen de los huevos, salen del huésped en sus heces (cuya etapa se pasa siendo un carácter específico de la especie), donde las larvas crecen, se desarrollan y mudan (Viney & Kikuchi, 2017). La autoinfección es un rasgo característico de esta infección que le permite establecerse indefinidamente. La forma clínica presenta un período de incubación de 14 a 30 días (Pérez-Molina et al., 2010).



<https://www.cdc.gov/dpdx/strongyloidiasis/index.html>

Figura 5. Ciclo de vida de *Strongyloides stercoralis* (CDC, 2020).

Hasta el momento la prevención está basada en la eliminación adecuada de excretas, uso de agua potable, medidas higiénicas de lavado de manos, desinfección de alimentos y uso de calzados adecuado en áreas en las que exista la posibilidad de que el suelo esté infectado y el tratamiento de los infectados (C. Wang et al., 2013). El diagnóstico se basa en el hallazgo de larvas en heces (DiGiulio, 2019). El tratamiento de la estrongiloidosis es complejo debido a que es necesaria la erradicación completa de estos helmintos para impedir la autoinfección. No se puede afirmar una cura verdadera sólo en base al examen negativo de materia fecal. Para el tratamiento de la estrongiloidosis se recomienda una dosis de 0.2 mg/kg de ivermectina por vía oral (Gotuzzo et al., 2016). En pacientes inmunocomprometidos (incluido el VIH), el tratamiento de la estrongiloidosis puede ser refractario y requiere tratamiento repetido cada 2 semanas (Corti, 2016).

1.2.4 *Schistosoma mansoni*

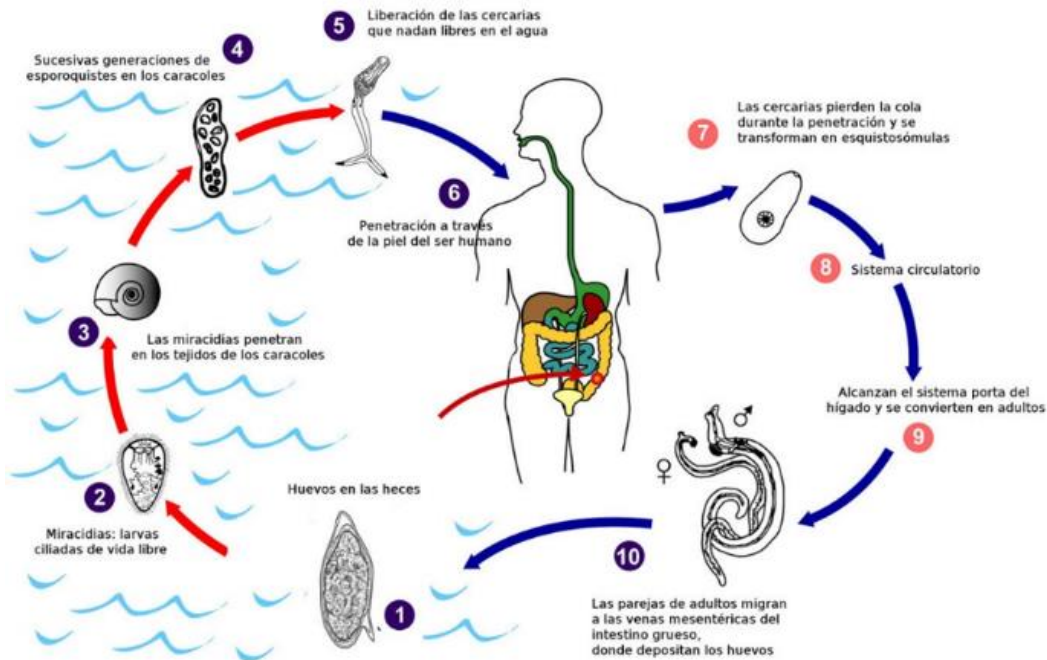
La esquistosomosis o bilharziasis, es la enfermedad causada por trematodos pertenecientes al género *Schistosoma* transmitida por penetración a través de la piel de cercarias emitidas por moluscos terrestres, *Schistosoma mansoni* es la especie causante de esquistosomosis intestinal en África y América, este parásito se distingue de otros trematodos por tener los sexos separados

(Magaisa, Taylor, Kjetland, & Naidoo, 2015). La esquistosomosis es una trematodosis por contacto con agua dulce contaminada con cercarias pertenecientes a cinco especies principales: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* y *S. mekongi* (Pérez-arellano & Bolaños-rivero, 2010).

Entre los trematodos el más prevalente es el género *Schistosoma* con seis especies en las que destacan tres: *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* y *S. japonicum* por el número de infectados (Hamid, 2019). Afecta a más de 250 millones de personas, siendo esencial en su patogenia los mecanismos inmunológicos y de evasión parasitaria (Chitsulo, Loverde, & Engels, 2004). Los principales datos que indican la posibilidad de una esquistosomosis crónica es la presencia de eosinofilia y de microhematuria en las infecciones ocasionadas por *S. haematobium* (Lackey & Horrall, 2020). Su ciclo de vida incluye a dos hospedadores, el ser humano como hospedador definitivo y un caracol acuático como hospedador intermediario. *S. mansoni* es un trematodo cuyo tegumento, es metabólicamente activo en la absorción de algunos nutrientes.

Su ciclo de vida incluye a dos hospedadores, el ser humano como hospedador definitivo y un caracol acuático como hospedador intermediario. El ciclo de vida comienza con la liberación de los huevos en las heces, al entrar en contacto con el agua (25 °C), se libera el miracidio, el cual busca hospedador intermedio, un caracol (*Biomphalaria glabrata*). Después en el caracol se originan docenas las cercarias, las cuales se liberan en agua con ayuda de la luz y están en condiciones de infectar (Zoni, Catalá, & Ault, 2016). Tras su penetración, la cercaria pierde la cola dando lugar a la esquistosómula, la cual inicia su migración por vía venosa al corazón, atraviesa el pulmon y llega a los lechos vasculares donde madura. Los vermes adultos de *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi* y *S. intercalatum* se localizan en los vasos mesentéricos, mientras que los de *S. haematobium* acceden al plexo perivesical urinario (Dvorák et al., 2008).

S. mansoni es un trematodo cuyo tegumento, es metabólicamente activo en la absorción de algunos nutrientes. Posee un aparato digestivo incompleto carente de ano. El macho que mide 12 mm de largo por 0.11 mm de ancho y la hembra que mide 16 x 0.015 mm se encuentran en las venas mesentéricas (Colley, Bustinduy, Secor, & King, 2014). Los huevos poseen morfología no operculada, con una “espina” que difiere en su posición, en cada especie de *Schistosoma*, cuando estos entran en contacto con agua dulce se producen los miracidios (Fig. 6) que penetran en los caracoles para multiplicarse y liberarse como cercarias infectivas (Dvorák et al., 2008).



<https://www.cdc.gov/dpdx/schistosomiasis/index.html>

Figura 6. Ciclo de vida de *Schistosoma mansoni* (CDC, 2020).

A modo de prevención, se recomiendan medidas de educación sanitaria, evitar contacto con aguas infectadas, mejoras en viviendas y tratamientos de aguas de consumo, residuales y en los sistemas de irrigación. Hasta el momento no existe ninguna vacuna efectiva, ni se ha logrado trasladar a los seres humanos los avances realizados en estudios de vacunas experimentales en modelos animales (Pérez-arellano & Bolaños-rivero, 2010). Su diagnóstico es mediante identificación de los huevos en heces (permite identificar las diferentes especies de esquistosomas, visualizando su morfología característica de la fase de huevo), biopsia o serología y el tratamiento es mediante el uso de Praziquantel (Chavasse, Brown, & Bell, 1979). Las formas clínicas son síndrome de Katayama, forma intestinal, forma hepatoesplénica crónica, pero también puede haber formas ectópicas con menos frecuencia.

1.3 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LAS PARASITOSIS

Los antiparasitarios son medicamentos indicados para el tratamiento contra los parásitos, algunos de los más usados en la medicina humana y veterinaria son para el caso de los protozoos

el metronidazol (Met) y para el caso de los helmintos la ivermectina (IV), el albendazol (Alb), mebendazol (Meb) y praziquantel (PZQ) (Buckner, Waters, & Avery, 2012).

1.3.1.1 Antiparasitarios

Para el tratamiento de la amebosis y tricomoniosis el fármaco de elección es el metronidazol y sus derivados imidazoles. Sin embargo, *E. histolytica* ha desarrollado un mecanismo de resistencia a esta droga sistémica (Wassmann, Hellberg, Tannich, & Bruchhaus, 1999), incluso se ha denunciado que cepas de *E. histolytica* presentan multirresistencia a diferentes fármacos. (Orozco et al., 2002). El metronidazol es un nitroimidazol con propiedades antibacterianas y antiprotozoarias, que se utiliza para tratar las infecciones producidas por *T. vaginalis* (Rodríguez-Luis et al., 2017), así como las amebosis y giardiosis. En los 80's se descubrió que este antibiótico era específico para *E. histolytica*. (Samuelson 1999). Es uno de los fármacos más eficaces frente a las bacterias anaerobias y en combinación con otros antibióticos, se utiliza para la erradicación del *Helicobacter pylori*. También es utilizado para el tratamiento de la enfermedad de Crohn, la diarrea asociada a los tratamientos antibióticos y la rosácea. Metronidazol es efectivo tanto frente a las células en fase de división como en las células en reposo. Debido a su mecanismo de acción, bajo peso molecular, y unión a las proteínas muy baja, es muy eficaz como antimicrobiano y prácticamente no induce resistencias, ya que actúa en la cadena transportadora de electrones, en la cadena respiratoria de las bacterias anaerobias y otros microorganismos, intercalándose en el ADN inhibiendo su síntesis (Vázquez, García, Pérez, & Palacio, 2001). Es eficiente frente a bacterias anaerobias como *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Eubacterium*, *Peptococcus*, y *Peptostreptococcus*. No es efectivo frente a bacterias aeróbicas comunes, aunque sí lo es frente a *Haemophilus vaginalis* (Müller, 1983).

Los antihelmínticos son un grupo de fármacos antiparasitarios que se utilizan para el tratamiento de las helmintosis. Provocan la muerte de los helmintos parásitos de manera rápida y completa, deteniendo su desarrollo o multiplicación, o haciendo que sean expulsados y por tanto disminuyendo la carga parasitaria. Entre los más utilizados se encuentra la ivermectina. Lactona semisintética cuyo mecanismo de acción es mediado por la interacción con los canales de iones, produciendo hiperpolarización y parálisis. Es particularmente útil contra la estrongiloidosis. Se absorbe por vía oral y una vez incorporado por el parásito actúa sobre su sistema nervioso y sus

células musculares. Posee afinidad a los canales de cloro dependientes de glutamato y su efecto es generar un incremento en la permeabilidad de la membrana celular a los iones de cloro con la consecuente hiperpolarización de la célula nerviosa, causando parálisis y muerte del parásito. La ivermectina es un agonista de los receptores GABA. No atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo tanto es muy segura (DiGiulio, 2019).

Los benzimidazoles, particularmente albendazol y mebendazol, son también fármacos de primera elección en el tratamiento de diferentes helmintosis (Tanowitz, Weiss, & Wittner, 2001) (World Health Organization, 2017). Actúan en el intestino y en el tegumento del parásito, uniéndose a la tubulina, inhibiendo así la polimerización y el ensamblaje de los microtúbulos (John, 2003). También se ha demostrado que albendazol inhibe la enzima fumarato reductasa, la cual es específica para los helmintos. Esta acción sobre la enzima ocurre especialmente en presencia de un ambiente bajo en NADH, que es una coenzima asociada a muchas reacciones de óxido-reducción (Siles-Lucas, Casulli, Cirilli, & Carmena, 2018). El mebendazol también se intercala en el sitio de la colchicina-tubulina e inhibe su polimerización y la formación de microtúbulos.

El praziquantel es el fármaco de elección contra muchas producidas por trematodos y cestodos. Es muy efectivo contra la esquistosomiasis (Chitsulo et al., 2004). Penetra en el parásito y lo paraliza, provocándole una alteración en el flujo de iones de calcio en sus células, dando una contracción muscular o disminuyendo la capacidad para contraerse o relajarse. De esa forma es expulsado, porque no consigue fijarse en el hospedador. También puede interferir con la absorción de la adenosina, de manera que son incapaces de sintetizar las purinas de “novo” (Angelucci et al., 2007). La pérdida de los microtúbulos en el parásito causa la nula captación de glucosa por los parásitos susceptibles, en especial, en los vermes adultos, consumiendo así los depósitos de energía del gusano. Alternativamente, el praziquantel controla la concentración de calcio intracelular, responsable de un desequilibrio metabólico sostenido. Esto explicaría el daño histológico inducido por este fármaco, cuyo mecanismo de acción aún no está claro (Angelucci et al., 2007).

1.3.1.2 Efectos adversos de los antiparasitarios

Algunos de los efectos colaterales asociados a la administración sistémica de los antiparasitarios incluyen náusea, diarrea y un sabor metálico en la boca, acompañada dolor de

cabeza, mareo, vómitos, glositis, estomatitis, parestesia u orina con coloración oscura o pardo rojiza. Las dosis elevadas o de larga duración en tratamientos con metronidazol se asocian con la aparición de leucopenia, neutropenia, riesgo de neuropatía periférica o toxicidad del sistema nervioso central (Pérez-Molina et al., 2010). Adicionalmente, el metronidazol forma parte de los medicamentos potencialmente carcinogénicos (Dingsdag & Hunter, 2018). Aunque se ha cuestionado la metodología de algunos de los ensayos clínicos, se ha demostrado la aparición de cáncer en animales de experimentación (National Toxicology Program. Metronidazole. 2016). Altas dosis de albendazol y mebendazol pueden causar teratogenicidad, aumento de enzimas hepáticas, cefaleas, alopecia, neutropenia, fiebre prurito, vértigo, náuseas, ictericia, dolor abdominal, problemas de coagulación, etc.

1.3.1.3 Resistencia a los antiparasitarios

Muchos de los fármacos utilizados contra los parásitos han dejado de tener efectividad tanto en producción animal como en las enfermedades que afectan al hombre (Han et al., 2019). Por tal motivo, en la actualidad se buscan alternativas con sustancias de origen natural y se ha puesto mucha atención a los extractos de plantas utilizados en la medicina tradicional, ya que el potencial antiparasitario de las plantas ha sido demostrado con sustancias como la berberina, emetina, quinina, quercetina y artemisinina, aislados de diferentes especies de plantas (Calzada, Yépez-Mulia, & Tapia-Contreras, 2007).

La resistencia descrita a los antiparasitarios se debe a alguno o varios de los siguientes factores: Actividad enzimática de PFO (piruvato ferredoxin oxidoreductasa) reducida, conformación alterada del hidrogenosoma, ferredoxina con un potencial redox excepcional y una cantidad reducida de ferredoxina intracelular (Vazquez *et al*, 2001). En 2015 Kumar y col. reportaron que la cepa de *E. histolytica* H1-IMSS expuesta a sobredosis de metronidazol mostraba resistencia inducida. En 1999, Land & Johnson reportaron que la resistencia a este fármaco por parte de *G. lamblia* se debe a una reducción de la actividad o alteración mutagénica de la enzima PFO (P. Kumar et al., 2015). La resistencia por parte de *T. vaginalis* al metronidazol se clasifica de dos tipos; i) tipo aeróbico y ii) tipo anaeróbico. En la de tipo aeróbico, se involucra las vías de depuración de oxígeno y la PFO, que es un sistema muy sensible a la presencia molecular del oxígeno, debido a que este compite como aceptor de

electrones e inhibe la actividad de la enzima. En el tipo anaeróbico el proceso de resistencia se da por reducción o por el cese de la actividad de la PFO (Orozco et al., 2002).

En *C. elegans*, la resistencia a ivermectina involucra una serie de genes como GluCl, glc-1, avr-14 y avr-15. El fenotipo de resistencia se moduló por mutaciones en las innexinas, unc-7 y unc-9, que son componentes esenciales de las uniones gap y se requieren para la locomoción normal y la puesta de huevos. Además se han descrito alteraciones en genes como dyf, osm-1, osm-5, dyf-11 y che-3, que tienen funciones en la función neuronal sensorial (Laing, Gillan, & Devaney, 2017).

En cuanto al mecanismo de acción del praziquantel, los mecanismos de resistencia por parte de los esquistosomas siguen sin estar claros. Algunos trabajos indican que el fallo en el tratamiento está correlacionado con las proteínas de transporte a ATP (W. Wang, Wang, & Liang, 2012).

1.4 SISTEMAS TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS

El interés de la liberación controlada y dirigida de fármacos a través de portadores se ha incrementado considerablemente durante los últimos años. Entre estos sistemas, se encuentran la microencapsulación y la nanoencapsulación en polímeros biodegradables, la cual es considerada como una tecnología emergente (Falk, Randolph, Meyer, Kelly, & Manning, 1997). Algunos polímeros usados frecuentemente en la encapsulación de fármacos son el ácido poli-láctico (PLA) y poli-DL-láctico-co-glicólico (PLG), los cuales son biodegradables, biocompatibles y no inmunogénicos (Lee, Yun, & Park, 2016). En la actualidad la tecnología farmacéutica está en constante búsqueda de un vehículo capaz de transportar el fármaco hasta su lugar de acción, a fin de evitar, en lo posible, sus efectos adversos. Por tanto, se han desarrollado sistemas de administración, como las micropartículas, liposomas y las nanopartículas, entre otros, siendo los particulados coloidales los preferentemente empleados como sistemas de liberación (Ramos Picos, Gómez Carril, Fernández Mena, & Núñez de la Fuente, 1999). Las nanopartículas muestran ventajas sobre las micropartículas y los liposomas, debido a su gran estabilidad y a la capacidad de liberar el fármaco de manera controlada (McClean et al., 1998).

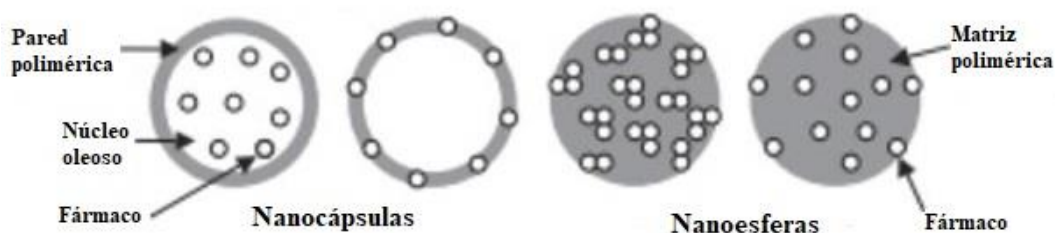


Figura 7. Representación de las nanopartículas (A) Nanocápsulas (B) Nanoesferas

1.4.1.1 Nanopartículas poliméricas como vectores farmacéuticos

Las nanopartículas poliméricas solidas (NPS) son partículas de menos de 1 μm de diámetro que se prepararan a partir de polímeros naturales o sintéticos (Fessi, Puisieux, Devissaguet, Ammoury, & Benita, 1989). El desarrollo de NPS (Fig. 7), se ha convertido en un área de investigación importante en el campo de la administración de fármacos, ya que tienen la capacidad de suministrar una amplia gama de compuestos para las diferentes vías de administración por períodos de tiempo sostenido. Las nanoesferas son de tipo matricial y en este caso los fármacos pueden ser adsorbidos en la superficie de la esfera o encapsulada dentro de la partícula (Del Pilar García-Corvillo, 2016).

Tabla 1. Polímeros utilizados como sistemas de liberación farmacéutica

Molécula	Polímero	Tamaño (nm)
Paclitaxel	PLGA	50 - 150
Vitamina E	PCL	120 - 300
Naringerina	Eudragit E	90 - 120
Quercetina	Eudragit L	50 - 200
Ibuprofeno	Eudragit E y L	80 – 300
Curcumina	Eudragit EPO	100 – 220
Ácido retinoico	PLA	160 - 320

(Reis & Neufeld, 2006)

Los vehículos por los cuales pueden ser formulados los fármacos pueden tener la característica de ser hidrofílicos o hidrófobos; así como de acuerdo con su origen pueden ser proteínas o macromoléculas biológicas. Se pueden formular para la absorción selectiva por el sistema linfático, sistema nervioso central, pulmones, hígado, bazo o circulación sistémica (Cebrián-Hernández et al., 2005). Por otra parte, los polímeros naturales no han sido

ampliamente utilizados para este fin, ya que varían en pureza, y a menudo requieren entrecruzamientos para aumentar la estabilidad física del formulado. En consecuencia, los polímeros sintéticos han recibido mayor atención en este ámbito (Tabla 1). Los más utilizados son PLA, PGA y sus copolímeros, PLGA y los polímeros de la familia Eudragit®, los cuales se usaron en esta investigación (Del Pilar García-Corvillo, 2016).

1.4.1.2 Nanopartículas para la administración de fármacos antiparasitarios

Como un nuevo método para formular fármacos, las NP proporcionan una forma prometedora para el tratamiento eficaz de las enfermedades parasitarias al superar las deficiencias de baja biodisponibilidad, baja permeabilidad celular, distribución inespecífica y eliminación rápida. En los últimos años, se han desarrollado algunos tipos de nanoportadores ideales para la administración de fármacos antiparasitarios (Sun et al., 2019). El tratamiento de algunas enfermedades parasitarias necesita de dosis frecuentes durante mucho tiempo, debido a los largos ciclos de vida de los parásitos. El tratamiento repetido puede causar estrés animal y principalmente resistencia a los medicamentos (Vercruysse, Schetters, Knox, Willadsen, & Claerebout, 2007). Para evitar estas limitaciones, se requieren enfoques novedosos para mejorar los efectos de los fármacos antiparasitarios. Uno de ellos es el desarrollo de la nanomedicina y su aplicación en el tratamiento de las enfermedades parasitarias (Sun et al., 2019).

Los nanoportadores orgánicos generalmente están hechos de polímeros naturales o sintéticos, lípidos sólidos a temperatura ambiente, fosfolípidos y colesterol. Estos materiales se preparan en partículas en rangos de tamaño entre 10 y 1000 nm y, por lo tanto, presentan algunas propiedades sobresalientes debido a su área de superficie específica sustancial y su fuerte adhesión (Wagner, Dullaart, Bock, & Zweck, 2006). Las NP, originalmente propuestas por Muller et al. 1991, son un novedoso sistema de suministro de medicamentos a nivel de nanoescala. Utiliza principalmente lípidos naturales o sintéticos como materiales para adsorber, encapsular o dispersar medicamentos. Combinando las ventajas de las emulsiones clásicas de aceite en agua, liposomas y nanopartículas de polímeros, como su fácil producción, así como la compatibilidad fisiológica y la biodegradabilidad (Müller, Mäder, & Gohla, 2000). Por ejemplo, la mayoría de los compuestos benzimidazólicos apenas se absorben, debido a su escasa solubilidad y estabilidad en el tracto gastrointestinal (Lu et al., 2017). Algunos medicamentos antiparasitarios como el metronidazol, la ivermectina y el praziquantel son susceptibles a la

degradación enzimática o la inactivación en animales. También muestran una penetración deficiente a través de las barreras de las membranas biológicas de los tejidos y las células, lo que también reduce la biodisponibilidad y apenas logra el efecto terapéutico esperado (Sarangi, Jana, Sahoo, Mohanta, & Manna, 2018). Algunas NP cargadas con fármacos antiparasitarios que se han desarrollado en los últimos años han mejorado en gran medida la biodisponibilidad oral y el tiempo de circulación. Algunos ejemplos son los observados con la administración de metronidazol, ivermectina y praziquantel en ratones y perros (M. Kumar & Awasthi, 2015; Xie et al., 2011, 2010).

1.4.1.3 Copolímeros derivados del poli-metacrilato (Eudragit®)

Los polímeros de la familia Eudragit® (Fig. 8) existen en el mercado desde la década de los 50's. Estos polímeros sintéticos de ácido acrílico y derivados, polimetacrilatos, son polímeros sintéticos catiónicos y aniónicos de metacrilatos de dimetil-aminoetilo, ácido-metacrílico y esteres del ácido metacrílico (Nguyen et al., 2006).

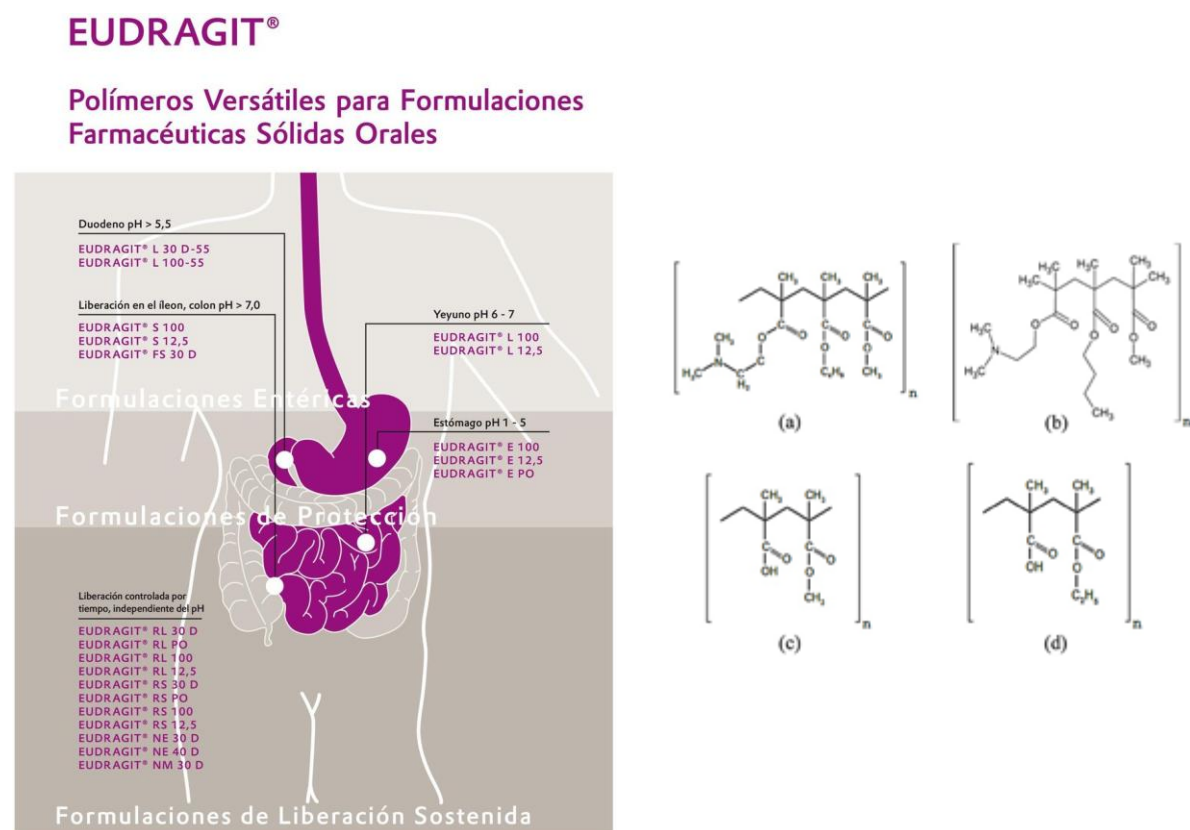


Figura 8. Órgano diana de liberación y estructura general de los polímeros Eudragit® **a):** EPO, **b):** E100, **c):** L100 and **d):** L100-55 (Ji, Lemberg, Prudic, Paus, & Sadowski, 2017; Patra et al., 2017).

Los copolímeros de polimetacrilato son agentes de recubrimiento de película bien conocidos para formas de dosificación oral como cápsulas o tabletas. Existen diferentes tipos de polímeros Eudragit que son copolímeros sintéticos de ácido metacrílico que consisten en diferentes proporciones de dimetilaminoetilmetacrilatos, ácido metacrílico y ésteres de ácido metacrílico (Hamman, 2010). Algunos de ellos son poli-cationes (Eudragit E, RL, RS y NE) debido a la presencia de grupos dimetilamino o grupos amino cuaternarios, mientras que otros son poli-aniones (Eudragit L y S) debido a la presencia de grupos carboxilato (Moustafine, Kabanova, Kemenova, & Van den Mooter, 2005). La primera referencia a una interacción iónica de Eudragit[®] fue en un estudio en el que los micronúcleos de quitosano que contenían diclofenaco de sodio como fármaco modelo se micro-encapsularon en Eudragit S-100 utilizando una técnica de evaporación de solvente en aceite para la liberación a nivel del colon (Alonso, Lorenzo-Lamosa, Remuñán-López, & Vila-Jato, 1998).

1.5 ACOPLAMIENTO MOLECULAR

El acoplamiento molecular (Molecular Docking) es un proceso mediante el cual pequeñas moléculas se acoplan a las estructuras macromoleculares para obtener sus valores complementarios en los sitios de unión. Es un área de investigación dinámica con una utilidad activa en el diseño de fármacos basados en estructuras, la optimización y la vía bioquímica para el diseño de fármacos. Dos pilares para un experimento de acoplamiento exitoso son la postura correcta y la predicción de afinidad (Saikia & Bordoloi, 2019).

El acoplamiento molecular es un método que anticipa la orientación favorecida del ligando contra el receptor (proteína) para hacer un complejo estable. La orientación favorecida posiblemente se utiliza para predecir la fuerza de la conexión o afinidad de unión entre el ligando y la proteína utilizando funciones de puntuación. El acoplamiento se aplica a menudo para anticipar la orientación de unión de los candidatos a fármacos contra objetivos de proteínas con el fin de predecir la afinidad y la actividad del fármaco (Chaudhary & Mishra, 2016). Por lo tanto, el acoplamiento desempeña un papel fundamental en el proceso de diseño y descubrimiento de un fármaco.

Los tipos de interacciones se separan generalmente en cuatro clases, (Duncan, 2015): Fuerzas electrostáticas - dipolo, dipolo de carga y carga-carga; fuerzas electrodinámicas

(interacción de Van der Waals); fuerzas estéricas (causadas por la entropía) y fuerzas relacionadas con los disolventes (puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas). El objetivo principal del acoplamiento molecular es simular computacionalmente el proceso de identificación molecular y lograr una conformación optimizada de manera que la energía libre del sistema global se minimice mediante el uso de *software* y plataformas computacionales para agilizar el proceso de descubrimiento y desarrollo de drogas (Duncan, 2015).

El aprovechamiento de la información química y biológica sobre los ligandos y/o los objetivos para descubrir y optimizar nuevos fármacos, el diseño de filtros *in-silico* para deshacerse de compuestos químicos con propiedades indeseables así como la identificación de nuevos objetivos de drogas a través de bases de datos (www.pdb.org) de estructuras de proteínas y la exploración virtual aplicada a encontrar nuevos candidatos a fármacos mediante la exploración de bases de datos, son los principales objetivos del modelado molecular para el descubrimiento de fármacos asistido por ordenador (Saikia & Bordoloi, 2019).

2 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA, JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

2.1 JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades parasitarias son enfermedades prevalentes a nivel mundial. En México, las parasitosis representan un problema importante de salud pública. Algunas de estas enfermedades son difíciles de tratar, debido a que los fármacos de elección en ocasiones presentan problemas de toxicidad. En los últimos años se han descrito numerosas cepas resistentes a dichos fármacos. Por tal motivo, en la actualidad se trabaja en estrategias para solucionar este problema, por un lado, se buscan nuevos principios activos, donde una alternativa son sustancias de origen natural, eficientes inclusive frente a las cepas resistentes. En este sentido, se ha puesto especial atención a los extractos vegetales, ya que el potencial antiparasitario de las plantas como fuente de nuevos fármacos ha sido demostrado con ejemplos como la emetina, quinina o artemisinina. La segunda estrategia se centra en la búsqueda de nuevas formas de presentación de las sustancias activas, donde las nanopartículas destacan como vectores de medicamentos incrementando su eficiencia terapéutica.

2.2 HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos de *A. mexicana* y *K. daigremontiana*, poseen un efecto antiparasitario *in-vitro* contra *E. histolytica*, *T. vaginalis*, *S. venezuelensis* y *S. mansoni*, además mejoran su desempeño al ser incorporados en nanopartículas poliméricas.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y estandarizar estudios preclínicos para determinar el efecto antiparasitario de fracciones activas de extractos metanólicos de *A. mexicana* y *K. daigremontiana* de forma libre e incorporadas en nanopartículas poliméricas.

2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener extractos metanólicos por maceración de *A. mexicana* y *K. daigremontiana* y evaluar la actividad antiparasitaria *in-vitro* de los extractos, fracciones o metabolitos de *A. mexicana* y *K. daigremontiana* en contra de *E. histolytica*, *T. vaginalis*, *S. venezuelensis* y *S. mansoni*.
2. Evaluar la actividad citotóxica y citoprotectora *in vitro* de extractos metanólicos, fracciones o metabolitos de *A. mexicana* y *K. daigremontiana*, mediante la técnica de hemólisis en eritrocitos humanos.
3. Identificar químicamente y por métodos espectroscópicos los compuestos de las fracciones activas.
4. Proponer el sitio de unión molecular de la molécula determinada en la fracción activa mediante análisis bioinformático.
5. Estandarizar la preparación de vectores nanoparticulados con polímeros biodegradables, que incorporen la fracción o metabolito más activo.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 REACTIVOS

Se utilizó alcohol polivinílico (PVA, Mowiol R° 4-88) y polímeros derivados de metacrilato Eudragit® (EPO, E100, L100 y L100-55), donados por Helm® México. Los reactivos 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH), benzylpenicillin streptomycin sulfate, berberina (Ber), dimetilsulfóxido (DMSO), ácido-etilendiaminotetraacético (EDTA), albendazol (Alb), ivermectina (IV), praziquantel (PZQ) y metronidazol (Met) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Merck Chemical Co. St. Louis, MO, USA). El medio de cultivo RPMI-1640 y el suero fetal bovino (SFB) se adquirieron en Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Todos los demás productos químicos y solventes fueron de grado analítico.

3.2 PARÁSITOS

Se trabajó con los protozoos *E. histolytica* y *T. vaginalis* proporcionados por el Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS. Monterrey, N.L. México. También se evaluaron los helmintos *S. venezuelensis* y *S. mansoni* proporcionados por el Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca (CIETUS, USAL) Salamanca, España. La ameba parásita *E. histolytica* cepa HM1:IMSS fue cultivada en medio de cultivo basal PEHPS (Peptona, Extracto de Hígado, Páncreas, Suero). El flagelado *T. vaginalis* cepa GT15 IMSS:0989 fue cultivada en medio PEHPS. El nematodo *S. venezuelensis* de la cepa donada por el Departamento de Parasitología de la Universidad de Minas Gerais (Belo Horizonte, Brazil) se mantiene *in vivo* en ratas Wistar en el laboratorio del CIETUS. Asimismo, *S. mansoni* se mantiene *in vivo* en caracoles (*Biomphalaria glabrata*) como hospedador intermediario y en ratones CD1 como hospedador definitivo en el laboratorio del CIETUS (USAL).

3.3 PLANTAS MEDICINALES

Las plantas medicinales, *A. mexicana* y *K. daigremontiana*, fueron obtenidas en la zona metropolitana de la ciudad de Monterrey, Nuevo León y fueron identificadas por el laboratorio

de botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas. Para los ensayos biológicos, se usaron extractos metanólicos de las hojas y tallos.

3.4 CULTIVOS AXÉNICOS DE LAS CEPAS

Las cepas de *E. histolytica* HM-1:IMSS y *T. vaginalis* GT-15 fueron cultivadas y mantenidas en medio peptona de caseína, extracto de hígado y páncreas, y suero bovino (PEHPS). Las cepas fueron subcultivadas tres veces a la semana y cosechadas a la mitad de su respectiva fase logarítmica. Las cepas de *E. histolytica* y *T. vaginalis*, en cultivo *in vitro*, fueron mantenidas en tubos con tapón de rosca de 13 x 100 mm con 5.5 mL de medio PEHPS, inoculados con 200,000 trofozoítos/mL de *E. histolytica*, o 100,000 trofozoítos/mL de *T. vaginalis*. Cada cultivo fue incubado a 37 °C, *E. histolytica* por 72 h y *T. vaginalis* durante 48 h. Antes de cada resiembra, cada cultivo era observado en un microscopio invertido para comprobar que no estuvieran contaminadas. Los cultivos se colocan en agua-hielo por 20 min para despegar las células adheridas, posteriormente se homogenizan. El conteo celular se determinó con un hemocitómetro. Cada cepa es inoculada en su respectivo medio de cultivo, bajo el tiempo calculado de acuerdo con su cinética de crecimiento.

La cepa *S. venezuelensis* se mantuvo mediante pases seriados en ratas Wistar machos, de la siguiente manera. Las ratas se infectaron subcutáneamente con 12,000 larvas de tercera etapa (L3) en 500 µL de solución salina tamponada con fosfato (PBS pH 7.4) usando una jeringa de aguja de calibre 25. Las heces de ratas infectadas se cultivaron en recipientes de 250 ml de polietileno con vermiculita, mezcladas con agua destilada durante 4 - 7 días, con 90 % de humedad relativa a 28 °C. Posteriormente, se recogieron las L3 usando el método Baermann (Fig. 9). La viabilidad de las larvas L3 se verificó utilizando un microscopio óptico antes de los ensayos. Las larvas se lavaron 3 veces con agua destilada que contenía 100 UI/mL de bencilpenicilina y 0,1 mg/mL de sulfato de estreptomicina (Martins et al., 2000). Posteriormente, se mantuvieron en agua destilada que contenía hipoclorito de sodio al 0,25 % durante 10 minutos y luego se procedió a realizar la suspensión de larvas para los ensayos correspondientes (Legarda-Ceballos, Rojas-Caraballo, et al., 2016).

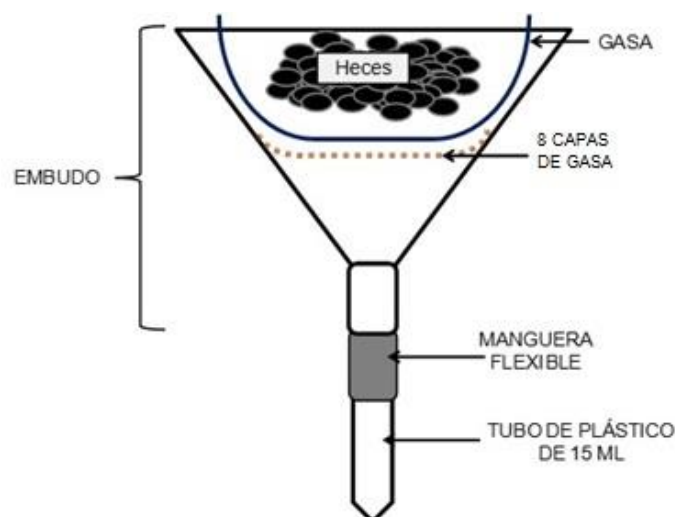


Figura 9. Representación esquemática del aparato de Baermann para la recuperación de larvas (Polomo, 2010).

Para *S. mansoni*, los vermes fueron obtenidos de ratones infectados mediante sacrificio, con 60 mg/kg de pentobarbital sódico (200 mg/mL, heparina 2 UI/mL). Después se retiró la piel hasta descubrir la pared abdominal, cuidando de no contaminar la región con pelos. Se cortó la caja torácica a lo largo del esternón hasta el mediastino. Los intestinos fueron separados para visualizar la vena porta donde se localizan los vermes. Se cortó sin seccionar completamente la vena porta y los vermes que brotaban fueron retirados. Los vermes restantes se obtuvieron perfundiendo con tampón fosfato salino (PBS) y heparina 500 UI/L, a través del ventrículo izquierdo. Los vermes se depositaron en placas Petri de 90 mm donde se mantenían temporalmente en la incubadora de CO₂ a 37 °C y 95 % de humedad. En la cabina de flujo se lavaban los vermes 3 veces, pasándolos cada vez, con la pinza apropiada, a una nueva placa de Petri. Finalmente se depositaba un verme o pareja por pocillo en una microplaca (Corning® Mod.3526) de plástico transparente de 24 pocillos de fondo plano con 500 µl de medio RPMI - 1640 (SFB 10 %), se incubaba 30 minutos hasta añadir 100 µL de los compuestos de estudio o los extractos a evaluar. El control positivo (C+) fue PZQ (10 µM), El control negativo (C-) fue solo medio de cultivo. Estos se mantienen en una incubadora de CO₂ a 37 °C y 95 % de humedad. Se evaluaron cada 24 horas durante 4 días.

Las curvas de crecimiento se llevaron a cabo por 120 h, inoculando 200,000 trofozoítos de *E. histolytica* y 100,000 trofozoítos de *T. vaginalis* en 5 mL de medio basal PEHPS adicionado con 10 % de suero bovino y 0.5 mg/mL de bilis bovina, en tubos de vidrio y tapón de rosca de 13

x 100 mm. Se incubaron a 37 °C durante 120 h y cada 24 h se determina el número de trofozoítos, evaluando sus magnitudes de crecimiento en el medio. Para la obtención de las magnitudes de crecimiento, tiempo de generación y tiempo de duplicación de los protozoarios se utiliza la prueba estadística de regresión lineal. Con el nematodo *S. venezuelensis* se siguió la metodología de Legarda Ceballos et al. (Legarda-Ceballos, López-Abán, et al., 2016a). Brevemente, las heces de las ratas infectadas se cultivaron con vermiculita y agua a 28 °C durante 4 días y luego se recuperaron las L3 utilizando un aparato de Baermann. El recuento de huevos fecales se realizó colocando a los animales individualmente en rejillas sobre papel absorbente limpio y húmedo y permitiéndoles defecar. Se recogieron muestras fecales individuales, se conservaron en una solución tamponada de formalina al 10% y se contaron los huevos por triplicado, mediante la técnica McMaster. Las mitades superiores del intestino delgado de las ratas experimentales se extrajeron en la necropsia, se cortaron longitudinalmente, se picaron y se colocaron en un vaso de sedimentación envuelto por 8 capas de gasa en solución salina tamponada con fosfato durante dos horas en 37 °C. Se recogieron hembras parásitas del sedimento y se contaron. Para el caso del trematodo *S. mansoni* se siguió la metodología descrita por Yepes et al. (Yepes et al., 2014) donde se obtienen vermes de ratones infectados con *S. mansoni* mediante sacrificio y disección, utilizándose un verme o una pareja de vermes por pocillo de la microplaca a diferentes concentraciones de estudio.

3.5 EXTRACCIÓN METANOLICA DE PLANTAS MEDICINALES

Se usaron hojas y tallos tanto de *A. mexicana* como de *K. daigremontiana*, proporcionadas por el Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León e identificadas por el Laboratorio de Botánica de la misma facultad. Posteriormente se les asignó un identificador. Después de esto, se procedió a secar las hojas y tallos de ambas por separado y a temperatura ambiente sobre una mesa para su secado más homogéneo. Al terminar el secado, el material fue molido con un molino manual. Los principios activos de *A. mexicana* y *K. daigremontiana* se obtuvieron mediante la extracción por maceración continua con solventes de diferente polaridad. Los solventes fueron hexano (Hex), cloroformo (CHCl₃), metanol absoluto (MeOH) y agua destilada (H₂O_d). Para ello, se procedió a tomar 100 g de las plantas y se depositaron en un matraz Erlenmeyer de 500 mL y se le adicionaron 300 mL de metanol absoluto. Se selló herméticamente para evitar la evaporación

del solvente durante la extracción. Se dejó en agitación constante por 72 h en un agitador orbital LAB-LINE 3508 (LAB-LINE Instruments, Inc. USA) a 100 rpm, a temperatura ambiente y recambio de disolvente cada 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de extracción, el solvente fue separado del resto del material vegetal mediante filtración con papel Whatman N°1. El extracto obtenido se filtró con papel filtro Whatman N° 1, se concentró a presión reducida a 45 °C con ayuda de un rotavapor (Rotary Evaporator, Laborota 4010 Heidolph® Germany). El solvente residual se evaporó a temperatura ambiente (Alejandro, Hernández, Rivas, & Cárdenas, 2015). Posteriormente, los extractos sólidos obtenidos se pesaron para calcular el porcentaje de rendimiento y se etiquetaron como AmH, AmT (extracto metanólico de hoja y tallo de *A. mexicana* respectivamente), KalH y KalT (extracto metanólico de hoja y tallo de *K. daigremontiana* respectivamente) y se almacenaron en oscuridad y refrigeración a 4 °C hasta su uso. A estos se le consideró como extractos en bruto o crudos. A todos los extractos se les determinó el rendimiento y se les realizaron pruebas químicas colorimétricas y pruebas biológicas. El procedimiento descrito se aplicó a tallos y hojas por separado.

3.5.1. Rendimiento

Se refiere a la cantidad de extracto obtenido de la planta expresado en porcentaje, para esto es necesario llevar el extracto a deshidratación completa y pesarlo. Para calcular el rendimiento para cada extracción, se utilizó la siguiente formula: Rendimiento en la que PE es el peso del extracto obtenido y PI es el peso inicial del material vegetal

$$\text{Rendimiento} \left(\% \frac{p}{p} \right) = \frac{PE}{PI} \times 100$$

3.6 PRUEBAS FITOQUÍMICAS BÁSICAS

Se utilizaron pruebas químicas convencionales para identificar los grupos funcionales en los extractos metanólicos de *A. mexicana* y *K. daigremontiana*. Se refiere a la identificación de metabolitos secundarios de los extractos de las plantas por métodos químicos. (Domínguez, 1973). Se identificarán los metabolitos secundarios en cada extracto de cada planta y se determinarán los posibles grupos funcionales mediante pruebas colorimétricas.

3.6.1 Prueba de Liebermann-Burchard

Para triterpenos y compuestos esteroidales. En una placa de porcelana se añade una gota del extracto, 1 gota de cloroformo y tres gotas del reactivo de Liebermann-Burchard (20 μ L de ácido sulfúrico más 1 mL de ácido acético anhidro y 1 mL de cloroformo). Se considera positivo cuando vira color azul o anaranjado.

3.6.2 Prueba de Salkowski

Para esteroides y metilesteroides. A 1 gota del extracto, se le añade 1 mL de cloroformo y 1 mL de ácido sulfúrico. Al contacto se observa un viraje de color hacia el amarillo o rojo en la presencia de estos compuestos.

3.6.3 Prueba de Baljet

Para sesquiterpenolactonas. Se utilizarán dos soluciones mezcladas en volúmenes iguales antes de usarse, reactivo 1: solución A: se disuelve 1 g de ácido pícrico en 100 mL de etanol; y la solución B: 10 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua bidestilada. A 3 gotas de los extractos, se agregan 4 gotas del reactivo 1. La coloración naranja a roja oscura representa una prueba positiva.

3.6.4 Prueba de Dragendorff

Para alcaloides. Modificación de Meunier y Machelobuf. Se obtuvo el reactivo 2: solución A: A 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua bidestilada, en la cual se le disolvieron 0.85 g de nitrato de bismuto; y solución B: se disolvieron 8 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua bidestilada. El reactivo 2 lo preparamos cuando mezclamos 5 mL de la solución A con 4 mL de la solución B y aforamos a 100 mL con agua bidestilada. A 1 gota del extracto se le agregaron 80 μ L del reactivo 2. Al contacto las muestras que se tornaron a una coloración roja o naranja persistentes por 24 h nos indica una prueba positiva.

3.6.5 Prueba para cumarinas

Se disolvieron 1-2 mg de la muestra en una solución de NaOH al 10 %. Si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidular, la prueba es positiva.

3.6.6 Prueba de permanganato de potasio

Para dobles enlaces. Se disuelven 2 g de permanganato de potasio en 100 mL de agua bidestilada. Pesamos 0.2 mg de cada extracto y agregamos 3 gotas del permanganato. Si se observa precipitado café la prueba es positiva.

3.6.7 Prueba de hidróxido de sodio

Disolver 2 mg de muestra en solución alcohólica de NaOH al 10 %. La presencia de color naranja que desaparece al agregar HCl indica la presencia de un anillo lactónico.

3.6.8 Prueba de cloruro férrico

Para oxhidrilos fenólicos. A 1 gota del extracto le agregamos 3 gotas de etanol y 20 µL de una solución de cloruro férrico (2.5 % en agua bidestilada). Al contacto, si aparece una coloración o precipitado rojo, azul o verde se considera positiva.

3.6.9 Prueba de bicarbonato de sodio

Para encontrar saponinas se mezclan 2 gotas de cada extracto de cada planta con 3 gotas de una solución de bicarbonato al 10 % y la aparición de burbujas en los tubos indica la presencia de estos compuestos.

3.6.10 Prueba de Shinoda

Para determinación de flavonoides. Se disuelven 1 mg de la muestra en 1 mL de etanol agregando unas gotas de ácido clorhídrico concentrado y una o dos limaduras de magnesio. Si la solución se torna a color rojo intenso, la prueba es positiva. Si aparece otro color como anaranjado, verde o azul pueden estar presentes flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas.

3.6.11 Prueba de 2,4-dinitrofenilhidrazina

Para identificar grupo carbonilo. Disolver 20 mg de 2,4- dinitrofenilhidrazina en 1 mL de metanol caliente. Se agregan 20 mg del compuesto carbonílico y se calienta a baño María por 10 min; se deja en reposo y se enfría en baño de hielo. La aparición de un precipitado naranja o rojo indica la presencia de un grupo carbonilo.

3.6.12 Prueba de la antrona

Determinación de carbohidratos; en un tubo de ensayo se colocan 0.5 - 1 mg de la muestra disuelta en agua, después se deja resbalar por las paredes del tubo una solución reciente de antrona al 0.2 % en ácido sulfúrico concentrado. La prueba es positiva si en la interfase aparece un anillo azul-verdoso o violeta.

3.7 PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

3.7.1 Actividad contra *E. histolytica* y *T. vaginalis*

La actividad de los extractos metanólicos y de sus fracciones contra trofozoítos de *E. histolytica* y *T. vaginalis*, se realizó mediante la técnica de microensayo (Mata-Cárdenas, Vargas-Villarreal, González-Salazar, Palacios-Corona, & Said-Fernández, 2008). En frascos ámbar, se prepararon soluciones concentradas del extracto metanólico crudo o sus fracciones (1 mg/mL) en dimetilsulfóxido (DMSO) al 5 % p/v. Estas soluciones se esterilizaron con filtros de membrana de nylon con poro de 0.22 μm (Merck Millipore, KGaA, Darmstadt, Germany). A partir de la solución madre concentrada se realizaron diluciones seriadas, con agua desionizada estéril. Las concentraciones de las soluciones de trabajo ensayo para determinar la CI_{50} fueron 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 y 1,000 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Se depositaron en viales estériles de 1 mL de capacidad (Bellco Biotechnology, Bellco Glass Inc., Vineland, NJ, USA), los cuales tenían una suspensión de trofozoitos de *E. histolytica* a una concentración de 2×10^4 trofozoítos/mL en fase logarítmica, en medio PEHPS adicionado con 10 % de suero bovino que se incubaron a 36 °C durante 72 h. Para el caso de *T. vaginalis*, fueron 1×10^5 trofozoítos/mL en fase logarítmica, en medio PEHPS adicionado con 10 % de suero bovino y se incubaron a 37 °C, 24 h. Pasado el tiempo de incubación, los viales se enfriaron en agua-hielo durante 20 minutos para finalmente determinar la cantidad de trofozoítos con ayuda de un hemocitómetro (Neubauer, Hausser Scientific, Horsham, PA). Como control positivo se utilizó metronidazol a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y como control negativo DMSO al 5 %. Para el caso de *T. vaginalis*, se realizó una dilución 1:10 con formalina para fijar y contar los trofozoítos. Una vez recopilados los resultados para cada parasito, se determinó la CI_{50} por medio del método estadístico Probit con un intervalo de confianza del 95 %. Los resultados fueron estimados como el porcentaje de inhibición del crecimiento comparado con los controles no tratados.

3.7.2 Actividad contra *S. venezuelensis* y *S. mansoni*

La actividad de los extractos metanólicos y de las fracciones contra *S. venezuelensis* se realizó mediante la técnica de microensayo en microplaca (Legarda-Ceballos, López-Abán, et al., 2016b; Yepes et al., 2014). En un tubo de microcentrífuga de 1,8 mL (Eppendorf AG, Germany), se prepararon soluciones madre del extracto metanólico crudo o sus fracciones (1 mg/mL) en dimetilsulfóxido (DMSO 5 % p/v). Estas soluciones se esterilizaron con filtros de membrana de nylon con poro de 0.22 μm . A partir de la solución madre concentrada se realizaron diluciones seriadas, con agua desionizada estéril. Las concentraciones de las soluciones de trabajo para determinar la concentración que inhibe el movimiento al 50% (CI_{50}) fueron 1, 10, 50, 100, 250, 500 y 1,000 $\mu\text{g/mL}$, y se depositaron en una microplaca de 96 pocillos para el caso de *S. venezuelensis* y en una microplaca de 24 pocillos para el caso de *S. mansoni*. En el caso de *S. venezuelensis*, la microplaca contenía una suspensión de 200 L3, las cuales se habían mantenido en preincubación (28 °C, 30 min), como medio de cultivo se utilizó agua destilada estéril. Se evaluó la viabilidad de las L3 cada 24 horas durante 4 días, mediante el uso de un microscopio invertido. Como control negativo (C-), se utilizó agua destilada y como control positivo (C+) IV al 10 μM . La CI_{50} de cada extracto se obtuvo por análisis Probit (SPSS versión 24). Cada ensayo se realizó por triplicado en tres experimentos independientes, calculando la media y el límite de confianza del 95 %. La IC_{50} se expresó como la concentración que produce una disminución del 50 % de las larvas de tercer estadio móviles. Las L3 de *S. venezuelensis* se recogieron mediante el método Baermann (Martins et al., 2000). Se obtuvieron un lote de L3, lavándose 3 veces con agua destilada estéril. Para cada ensayo se ajusta a 8.000 L3 y se ponen 100 μL con 200 larvas por pocillo de la microplaca, en la que se realizará el ensayo con los tratamientos a evaluar. Estas larvas son preincubadas (30 min / 28 °C) antes de los tratamientos. Los tratamientos previamente son solubilizados en DMSO al 0.5 %.

En cuanto a *S. mansoni*, la microplaca contenía un verme o pareja por pocillo con 500 μL de medio de cultivo. Se preincubó 30 min para su adaptación y después se añadieron los compuestos o los extractos de estudio a una cantidad de 100 μL a las concentraciones (1, 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1,000 $\mu\text{g/mL}$) a evaluar. El control positivo (C+) consto de PZQ (10 μM), El control negativo (C-) fue solo medio de cultivo. Estos se mantuvieron en una incubadora de CO_2 a 37 °C y 95 % de humedad. En este caso se evaluó la viabilidad de las larvas mediante su visualización en un microscopio invertido, a las 0, 24, 48, 72 y 96 h (Legarda-Ceballos, Rojas-

Caraballo, et al., 2016). La preparación de los vermes para las evaluaciones biológicas se basó en la metodología descrita por Yepes y col., en 2014 (Yepes et al., 2014). La cepa fue mantenida *in vivo* en ratones infectados con 150 cercarias de *S. mansoni*. Los vermes se obtuvieron de los ratones infectados con 45-70 días post-infección, mediante sacrificio del animal, con 60 mg/kg de pentobarbital sódico (200 mg/mL, heparina 2 UI/mL). Se mantuvieron en medio de cultivo: RPMI-1640, 10 % RS (suero de rata inactivado a 56 °C), 2mM de L-Glutamina, 100 IU/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomycin en una incubadora de CO₂ a 37 °C y 95 % de humedad (Yepes et al., 2015).

3.8 FRACCIONAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITO ACTIVO

3.8.1 Fraccionamiento con solventes

Para el proceso de fraccionamiento de los extractos crudos, se realizaron particiones utilizando solventes de diferente polaridad. La primera fracción se realizó con el total de cada extracto crudo y 100 mL de hexano que se mantuvo en agitación magnética durante 25 min a 25°C, posteriormente se filtró con papel Whatman N° 1. Al residuo se le adicionó por segunda vez hexano (Fr1), después el residuo anterior se extrajo con 3 porciones de 100 mL de CHCl₃ y se filtró con papel Whatman N° 1 nuevamente (Fr2). El sólido residual se extrajo con MeOH absoluto (4 x 100 mL) y se filtró con papel Whatman N° 1 (Fr3). A continuación, al sólido insoluble obtenido se le añadió 100 mL de MeOH absoluto nuevamente, calentándose a 80 °C durante 4 min en una plancha para ser solubilizado (Fr4) y se filtró con papel Whatman N° 1 y finalmente al filtrado se le agregó 100 mL de H₂O (Fr5). Esta fracción fue congelada a -20°C y se liofilizó a -50 °C/0.220 mBar (FreeZone 2.5 Liter Benchtop Freeze Dryer, LABCONCO, Missouri, USA).

3.8.2 Fraccionamiento por métodos cromatográficos

El extracto con mayor actividad fue sometido a fraccionamiento con diferentes métodos cromatográficos, con el propósito de separar e identificar los compuestos que presentan dicha actividad.

3.8.3 Cromatografía en capa fina (TLC)

La TLC es una técnica cualitativa que permite verificar la pureza de los componentes del extracto o fracciones. Consiste en una placa de vidrio con una fase estacionaria de sílica-gel, utilizando sulfato de calcio como aditivo. La fracción o mezcla se disuelve en un solvente y se coloca con un capilar en la cromatoplaque, la cual es introducida en una cámara cromatográfica que contiene una fase móvil. El eluyente va a subir por capilaridad a través de la cromatoplaque y se produce la separación de los componentes de la mezcla (Kagan & Flythe, 2014). Una vez terminado el proceso de separación, la cromatoplaque es retirada de la cubeta. Se secó y se observó con una lámpara UV, donde se identifican los diferentes compuestos distribuidos a lo largo de la cromatoplaque (Textbook of Practical Organic Chemistry). Se utilizaron placas de sílica-gel 60 (Merck® Germany). Las muestras aplicadas con el capilar se colocaron a 1 cm de la parte inferior de dichas muestras y se aplicaron de 3 a 5 veces en el mismo punto para concentrar los metabolitos. Después se colocó en una cuba cromatográfica, con eluyente para su separación y se observó a luz visible y UV. Como revelador se utilizó cloruro de cobalto, y finalmente se calculó el R_f de la siguiente manera: Distancia recorrida por el compuesto / Distancia recorrida por el solvente.

3.8.4 Análisis Espectroscópico

Se analizaron las fracciones con actividad biológica mediante HPLC-DAD y HPLC-MS. Para ello, se tomaron 15 mg de las fracciones secas y se disolvieron en 2 mL de una mezcla de metanol-acetonitrilo (50:50) y se filtraron con membrana de nylon de 0.2 μm (Millipore). Para el análisis se utilizó un cromatógrafo de líquidos Alliance 2695 (Waters, USA) con detector de arreglo de diodos y un espectrómetro de masas LCQ Fleet (Thermo Scientific) con fuente de ionización de *electrospray* y analizador de trampa de iones. El análisis por HPLC se realizó empleando una columna Kinetex PFP de 50 x 2.1 mm (Phenomenex, USA). Como fase móvil una mezcla de una solución acuosa de ácido fórmico (1 %) y metanol, iniciando con un 30 % de metanol e incrementando linealmente hasta 80 % en 20 minutos, regresando a las condiciones iniciales en el minuto 21 y acondicionando 10 min antes de la siguiente inyección. El flujo de fase móvil fue 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, la columna se mantuvo a temperatura ambiente y el volumen de inyección utilizado fue de 3 μL . El análisis de las fracciones por espectrometría de masas se realizó por infusión directa. Se utilizó nitrógeno a un flujo de 30 unidades como gas de

nebulización (*sheath gas*). La ionización se realizó en modo positivo, el voltaje del capilar de *electrospray* utilizado fue de 5 kV, mientras que el voltaje del capilar de solvatación fue de 43 (V) y su temperatura de 275 °C. El voltaje del tubo de lentes se fijó en 75 V (Liu, Li, Shi, & Zhong, 2011). La adquisición de datos se realizó en modo de barrido completo (*full scan*) de m/z 100 a 1000 y experimentos de masas/masas para los iones más intensos, utilizando el modo de disociación inducida por colisión (*collision induced dissociation, CID*) ajustando la energía de colisión normalizada (*normalized collision energy*) para obtener una fragmentación adecuada con una ventana de aislamiento (*isolation width*) de 1 m/z , un voltaje de RF de activación (*activation Q*) de 0.25, un tiempo de activación de 30 ms (Tang, Zheng, Chen, Yang, & Du, 2014). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

3.9 PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD Y CITOPROTECCIÓN

3.9.1 Citotoxicidad mediante la prueba de hemólisis

La evaluación de la citotoxicidad se determinó mediante la prueba de hemólisis de una suspensión de eritrocitos humanos, para esto, se obtuvo sangre humana de donantes sanos, la cual se dejó reposar a temperatura ambiente 25 min. Después de retirar el suero con una pipeta de transferencia, agregamos EDTA (1.5 mg/mL de sangre) para lavar los eritrocitos, que se mezclaron cuidadosamente y se separaron mediante centrifugación a 54 g (5 min / 37 °C). El paquete celular se lavó y centrifugó cuatro veces en solución amortiguadora con fosfato (PBS 10 mM, pH 7.4) con eliminación de los sobrenadantes. Los eritrocitos obtenidos se utilizaron posteriormente para preparar una suspensión de eritrocitos (5 % v/v en PBS) para los ensayos. Para la evaluación de la citotoxicidad del extracto sobre los eritrocitos, la suspensión de glóbulos rojos previamente preparada se incubó con diferentes concentraciones del extracto (50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 µg/mL) en tubos de microcentrífuga (Eppendorf® AG, Germany) de 2 mL, durante 30 min, 37 °C protegidos de la luz, estos se catalogan como tratamientos (Tr). El control negativo consistió en eritrocitos sin tratamiento (C-) y al control positivo se le añadió agua destilada estéril para producir la hemólisis osmótica de los eritrocitos (C+) (G. Kumar, Loganathan, & Rao, 2011). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron todos los tratamientos a 9,085 g (3 min / 4 °C). Se tomaron 200 µL de sobrenadante y se pusieron en una microplaca (Costar Corning Incorporated, New York, USA) de plástico, transparente de 96 pocillos de fondo plano. El grado de hemólisis se determinó mediante lecturas

espectrofotométricas a 540 nm, longitud de onda de máxima absorción de la hemoglobina liberada en el sobrenadante, en un lector de microplacas (BioTek™ EPOCH™ Microplate Spectrophotometer). Las lecturas se registraron como la absorbancia (Abs) obtenida por cada tratamiento (Abs Tr) y finalmente, se calculó el porcentaje de hemólisis utilizando la fórmula:

$$\% \text{ Hemólisis} = \left[\frac{(\text{Abs Tr}) - (\text{Abs C-})}{(\text{Abs C+}) - (\text{Abs C-})} \right] \times 100$$

3.9.2 Bioensayo de Citoprotección mediante el método de AAPH

Se empleó el método propuesto por Karimi et al. 2011 (Karimi, Aghasizadeh, Razavi, & Taghiabadi, 2011). Para este ensayo, se obtuvo una suspensión de eritrocitos de la manera descrita en el ensayo de hemólisis. La suspensión se ajustó al 10 % v/v con PBS pH 7,4 para ser utilizada el mismo día. La hemólisis inducida se realizó mediante la adición del reactivo AAPH a 150 mM preparado en el mismo tampón fosfato. Para evaluar el efecto citoprotector de los extractos o fracciones, los glóbulos rojos obtenidos previamente se incubaron en tubos de microcentrífuga Eppendorf® de 2 mL con diferentes concentraciones del extracto (50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1,000 µg/mL) más el AAPH a 2 g (5 h/37 °C) en una incubadora de rotación (LUZEREN® THZ-100) protegidos de la luz, estos se catalogaron como tratamientos (Tr). Como control negativo de hemólisis (C-), se usó el tampón fosfato con la suspensión de eritrocitos sin incluir AAPH y como control positivo se utilizó la solución de eritrocitos con AAPH (C+). Después de transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron todos los tratamientos a 9,085 g (3 min/4 °C). Se tomaron 200 µL de sobrenadante y se pusieron en una microplaca de plástico, transparente de 96 pocillos con fondo plano. El grado de hemólisis se determinó mediante lecturas espectrofotométricas a 540 nm, en un lector de microplacas. Las lecturas se registraron como la absorbancia (Abs) obtenida por cada tratamiento (Abs Tr) y finalmente, se calculó el porcentaje de citoprotección utilizando la fórmula:

$$\% \text{ Citoprotección} = \left[1 - \frac{(\text{Abs Tr}) - (\text{Abs C-})}{(\text{Abs C+}) - (\text{Abs C-})} \right] \times 100$$

3.10 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE UNIÓN MOLECULAR (*Molecular Docking*)

La estructura cristalina de rayos X de la molécula determinada mediante las técnicas anteriormente mencionadas, fue descargada desde PubChem Database (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). La estructura cristalina de rayos X del complejo donde interactúa dicha molécula, fue descargada del sitio Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>). A esta estructura se le realizó un paso de minimización de energía usando el software SPDBV versión 4.10 para reparar las geometrías distorsionadas (Raghav, Ashraf, Mohan, & Rathinasamy, 2017). El acoplamiento molecular se realizó mediante el software Autodock 4.0 versión libre para Microsoft® Windows, en este caso se utilizó una laptop con sistema operativo Windows™ 10 professional. El software Chems sketch se utilizó para crear estructuras tridimensionales limpias de la molécula descargada de PubChem en formato de archivo MOL. OpenBabel se utilizó para convertir los archivos MOL en archivos PDB. Para procesar, preparar y modelar las moléculas fue utilizado el software Autodock-Vina. Las operaciones de acoplamiento *Docking*, de la molécula y la proteína, se realizaron manteniendo el receptor como rígido y el ligando como una molécula flexible. Los parámetros de cuadrícula y Dock se mantuvieron constantes para todas las ejecuciones. Un algoritmo genético lamarckiano de 100 interacciones se repitió 15 veces independientes, y los resultados se agruparon con una distancia cuadrática media (RMSD) de 2.00 Å. Los resultados se analizaron a partir del gráfico de agrupamiento. Los grupos se compararon en función del tamaño del grupo y la energía de unión. El grupo con el mayor número de confirmaciones y la energía de enlace más baja se seleccionó como el grupo más favorable. La conformación y la energía de unión se analizaron con la ayuda de AutoDock Tools 1.5.6 y Chimera 1.9 ambos para Windows™ 10 (Rizvi, Shazi, & Mohd., 2013).

3.11 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Se evaluaron diferentes polímeros para la obtención de nanopartículas poliméricas (NP) con características definidas. Las condiciones experimentales de cada técnica fueron manipuladas a fin de obtener un tamaño (T) de nanopartículas menores a 300 nm y con el índice de polidispersidad (PDI) de 0.2 o menor. Las NP fueron preparadas por la técnica de nanoprecipitación (Khayata, Abdelwahed, Chehna, Charcosset, & Fessi, 2012) (Fig. 10). Se

midio el T y el PDI de las NP por el procedimiento de dispersión de luz dinámica, en un Nanosizer Nano ZS (Malvern). Para realizar estos ensayos, utilizamos una fase orgánica (FO) miscibles con agua la cual contenía disuelto el polímero, esta FO fue inyectada en una fase acuosa (FA) que contenía PVA 2 % (p/p), bajo agitación magnética constante. Los polímeros Eudragit® EPO, E100, L100 fueron disueltos en MeOH y L100-55 en Acetona. La difusión de la FO en la FA favoreció la agregación del polímero formador, dejando a las NP en suspensión (Fessi et al., 1989). La suspensión obtenida se sometió a evaporación a presión reducida en un rotaevaporador Laborota 4003 (Heidolph Co. Germany) para la eliminación de los solventes y finalmente se prosiguió a su caracterización física. Las combinaciones realizadas en este estudio fueron las siguientes: relación del efecto del aumento de FO sobre FA y masa de polímero (M) (12 mL, 50 mg) constantes, efecto del aumento de la FA sobre FO y M (12 mL, 50 mg) constantes y el efecto de al aumento en la M sobre FO (12 mL) y FA (12 mL) constantes.



Figura 10. Esquema de la técnica de nanoprecipitación.

Para evaluar la influencia de las diferentes combinaciones sobre el T de NP y el PDI preparadas mediante el método de nanoprecipitación. Las cantidades usadas fueron las siguientes, para el caso de la FO y FA fue de 5, 8, 10, 12, 15, 18 y 20 mL respectivamente y para el caso de M las cantidades fueron 5, 10, 25, 50, 75 y 100 mg de cada polímero. Cada lote fue realizado por triplicado. Para la determinación del T y PDI, las formulaciones de NP se les determinó su T y PDI promedio por espectroscopia de correlación fotónica por

microelectroforesis con láser doopler en un Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, USA), a partir de una alícuota de cada lote diluida en agua Milli-Q (Y. Wang, Li, Tran, Zhang, & Kong, 2016). Además, el tamaño y la morfología de los NP se analizó con un microscopio electrónico de barrido (SEM) (Hitachi SEM-SU8000, Japón) a 2 kV. Las muestras fueron diluidas (1:100), montadas y secadas en tacos de metal.

La determinación del porcentaje y de la eficiencia de encapsulación (EE) del componente principal que se encuentra en la fracción con mejor actividad, se realizó a partir de seleccionar la mejor formulación en cada polímero evaluado a las cuales se les incorporó dicho analito mediante la técnica de nanoprecipitación. Estos formulados fueron ultra-centrifugados (Allegra 64 R Centrifuge, Beckman-Coulter, Brea, CA) a 33,600 g (4 h/5 °C). Posteriormente, la pastilla de NP fue liofilizada a -48 °C (120 mbar /24 h) y una cantidad conocida de pastilla se disolvió en metanol y fue analizada mediante el uso de un espectrofotómetro, y mediante la preparación previa de una curva de calibración del estándar del analito a evaluar. El porcentaje y eficiencia de encapsulación se calcularon considerando las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Encapsulación} = \left[\frac{\text{analito encapsulado (mg)}}{\text{NP con analito (mg)}} \right] \times 100$$

$$\% \text{ Eficiencia de encapsulación} = \left[\frac{\text{analito encapsulado (mg)}}{\text{analito en la fase orgánica (mg)}} \right] \times 100$$

3.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado, con tres repeticiones. Los valores se muestran como la media y desviación estándar (DE) con un intervalo de confianza (IC) del 95 %. El análisis estadístico fue realizado con el paquete estadístico SPSS, ver. 24 (SPSS Inc.). Para la obtención de las magnitudes de crecimiento, tiempo de generación y tiempo de duplicación de los protozoos se utilizó la prueba estadística de regresión lineal. La concentración inhibitoria del movimiento al cincuenta por ciento (CI₅₀) se determinó con la prueba de Probit. Las diferencias significativas entre los grupos se determinaron mediante el análisis de varianza de 1 vía (ANOVA de 1 vía), seguida de la prueba de honesta de significancia (HSD) post hoc de Tukey para determinar cualquier diferencia estadística entre los controles tratados y no tratados.

4 RESULTADOS

4.1 PRUEBAS FITOQUÍMICAS

En este estudio se evaluó la actividad amebicida, tricomonocida y antihelmíntica de los extractos metanólicos de hojas y tallos de *A. mexicana* y de *K. daigremontiana*, así como de las fracciones de estos, obtenidos por partición con solventes de distinta polaridad. También se identificó el metabolito con la actividad antes mencionada, mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas. Finalmente se evaluó el activo. Los rendimientos de extracción por maceración fueron del 10.6 y 13.0 % para hojas y tallos secos de *A. mexicana*, y de 10.0 y 12.7 % para *K. daigremontiana* respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis fitoquímico básico del extracto crudo de hojas y tallos de *A. mexicana* y *K. daigremontiana*

Prueba	AmH	AmT	KalH	KalT
Insaturaciones	+	+	+	+
Grupo carbonilo	-	-	-	-
Cumarinas	-	-	-	-
Sesquiterpenlactonas	-	-	-	-
Quinonas	+	+	+	+
Triterpenos - esteroides	+	+	+	+
Grupo carboxilo	-	-	-	-
Grupos fenólicos	+	+	+	+
Saponinas	+	+	+	+
Flavonoides	+	+	+	+
Carbohidratos	+	+	+	+
Alcaloides	+	+	-	-
% Rendimiento	10.55	13	9.95	12.74

Ausente: -, Presente: +

4.2 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO

Se realizaron las cinéticas de crecimiento de *E. histolytica*, y *T. vaginalis*. *E. histolytica* presentó un tiempo de generación de 6.29 h y tiempo de duplicación de 4.34 h, a las 72 h se encuentra en fase exponencial. Sin embargo, *T. vaginalis* tiene un tiempo de generación de 5.8 h y tiempo de duplicación de 4 h, a las 48 h llega a su fase exponencial (Fig. 11).

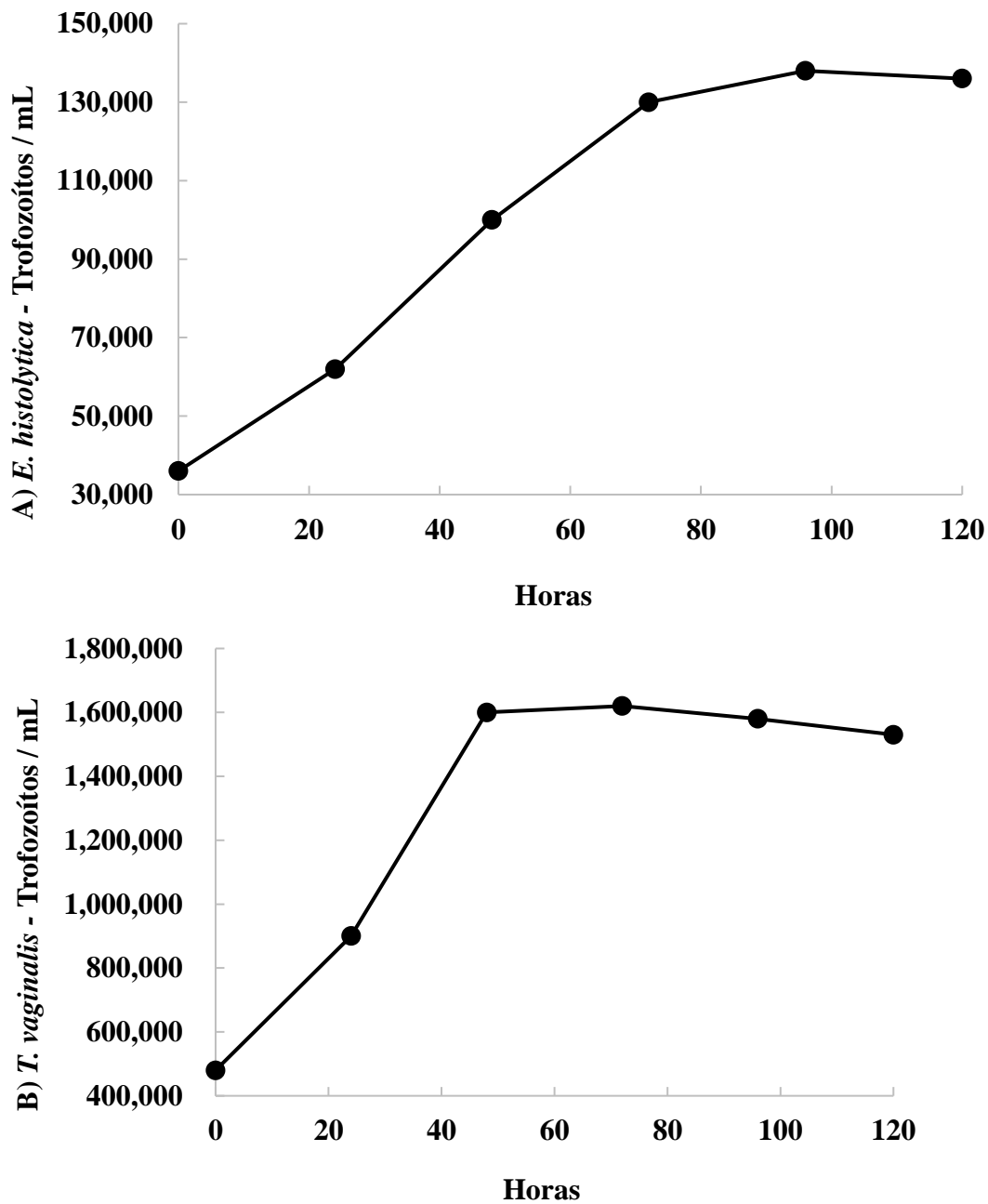


Figura 11. Cinética de crecimiento de *E. histolytica* (A) y *T. vaginalis* (B) en medio PEPHS + 10% SFB. Cada punto corresponde a tres determinaciones en tres experimentos independientes ($p < 0.05$).

4.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

La concentración inhibitoria media (IC₅₀) de los extractos crudos de ambas plantas contra *E. histolytica*, *T. vaginalis* y *S. venezuelensis* para los fármacos de referencia Met e IV. Una vez determinada la actividad de los extractos, se procedió a su purificación parcial del extracto con mejor actividad por medio de su fraccionamiento por solubilidad en 5 distintas polaridades.

Tabla 3. Concentración inhibitoria media (IC₅₀) (media \pm DE) de los extractos crudos de *A. mexicana* y *K. daigremontiana* contra *E. histolytica*, *T. vaginalis* y *S. venezuelensis*.

Tratamientos ($\mu\text{g/mL}$)	<i>E. histolytica</i>	<i>T. vaginalis</i>	<i>S. venezuelensis</i>
AmH	75.1 \pm 2.27*	67.16 \pm 1.60*	92.12 \pm 4.68*
AmT	138.4 \pm 4.14*	70.75 \pm 1.89*	101 \pm 5.46*
KalH	166.7 \pm 1.98*	117.8 \pm 3.85*	ND
KalT	192.4 \pm 5.32*	ND	ND
Met	0.14 \pm 0.03	0.07 \pm 0.01	-
IV	-	-	1.2 \pm 0.01
ANOVA <i>p</i>	0.008	< 0.001	0.002
<i>F</i> (3,28)	3.47	4.07	4.06

ND: No determinado por no alcanzar la mitad de la inhibición a 200 $\mu\text{g/mL}$. *Diferencias estadísticamente significativas comparado con el fármaco control (metronidazol o ivermectina) *post hoc* HDS de Tukey, $p < 0.001$.

En la tabla 4 se muestra el ensayo de la evaluación de la vitalidad sobre *S. mansoni*. Se marca con + como vivo y con - como muerto, estas mediciones se realizaron a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas.

Tabla 4. Efecto de los extractos de hoja y tallo de *A. mexicana* y *K. daigremontiana* sobre la motilidad media de 9 parejas adultos de *S. mansoni* por concentración, en cultivo a las 24, 48, 72 y 92 horas comparados con praziquantel (10 µM).

	<i>A. mexicana</i>									<i>K. daigremontiana</i>							
	Hoja					Tallo				Hoja				Tallo			
	Horas																
µg/mL	0	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
100	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
250	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
500	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
1,000	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PZQ	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Móvil +Inmóvil -																	

4.4 ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LAS FRACCIONES

Una vez realizados los ensayos con los extractos crudos de ambas plantas, seleccionamos el más activo, en este caso fue el extracto de hoja de *Argemone mexicana*, al cual se le procedió a fraccionar con solventes de diferentes polaridades, ya mencionados en la metodología. Posteriormente se evaluó su actividad en los parásitos antes descritos en la tabla 5. Se observan los resultados mediante la prueba de Probit, donde la fracción con mejor actividad fue la fracción 4 (AmH 4).

Tabla 5. Concentración inhibitoria media (IC₅₀; media \pm DE) de las fracciones de *A. mexicana* frente *E. histolytica*, *T. vaginalis* y *S. venezuelensis*

Tratamientos ($\mu\text{g/mL}$)	<i>E. histolytica</i>	<i>T. vaginalis</i>	<i>S. venezuelensis</i>
AmH 1	54.47 \pm 3.75*	72.75 \pm 3.12*	28.03 \pm 1.94*
AmH 2	73.07 \pm 4.68*	ND	ND
AmH 3	66.09 \pm 1.06*	69.16 \pm 3.28*	44.70 \pm 0.41*
AmH 4	39.83 \pm 2.42*	55.66 \pm 2.81*	15.13 \pm 1.37*
AmH 5	ND	ND	ND
Met	0.14 \pm 0.03	0.07 \pm 0.01	-
IV	-	-	1.2 \pm 0.01
ANOVA <i>p</i>	0.005	0.001	< 0.001
<i>F</i> (3,12)	126.15	28.69	3.10

ND: No determinado por no alcanzar la mitad de la inhibición a 200 $\mu\text{g/mL}$. *Diferencias estadísticamente significativas comparado con el fármaco control (metronidazol o ivermectina), *post hoc* HDS de Tukey, $p < 0.001$.

4.5 IDENTIFICACION DEL COMPONENTE ACTIVO

Una vez realizadas las pruebas fitoquímicas de los extractos en bruto y la determinación de la actividad antiparasitaria de los extractos y las fracciones, se seleccionó la fracción activa y con respuesta presente con la finalidad de la identificación del componente activo mediante distintos métodos previamente descritos: TLC, HPLC-DAD, HPLC – MS, ^1H -RMN y ^{13}C -RMN.

4.5.1 IDENTIFICACION POR TLC

Mediante cromatografía de capa fina (TLC), analizamos los extractos AmH y AmT, también procesamos las fracciones más activas AmH3 y 4. Ya que estos extractos dieron positivo para alcaloides, se decidió evaluar el estándar de Ber y como se observa en la figura 12, la similitud en su R_f : 0.74 es representativo de dicho alcaloide en los extractos crudos y fracciones activas.

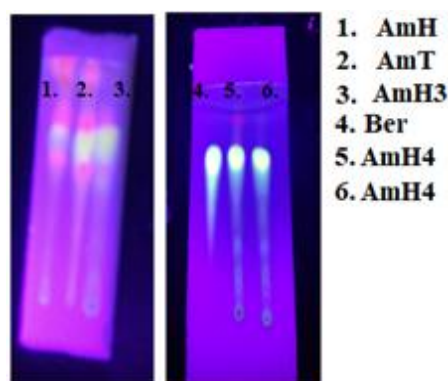


Figura 12. Cromatografía de capa fina (TLC) de los extractos AmH, AmT, AmH3, AmH4, AmH4 y berberina (Ber) en placa de gel de sílice 60 con 10 mL de CHCl_3 :MeOH (9:1) como eluyente y expuesta a luz ultravioleta de 254 nm.

4.5.2 IDENTIFICACION POR METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS

Los extractos crudos se analizaron por HPLC-DAD y como puede verse en las figuras 13A y 13B, presentan un perfil cromatográfico similar al del tiempo de retención de berberina (Fig. 13C).

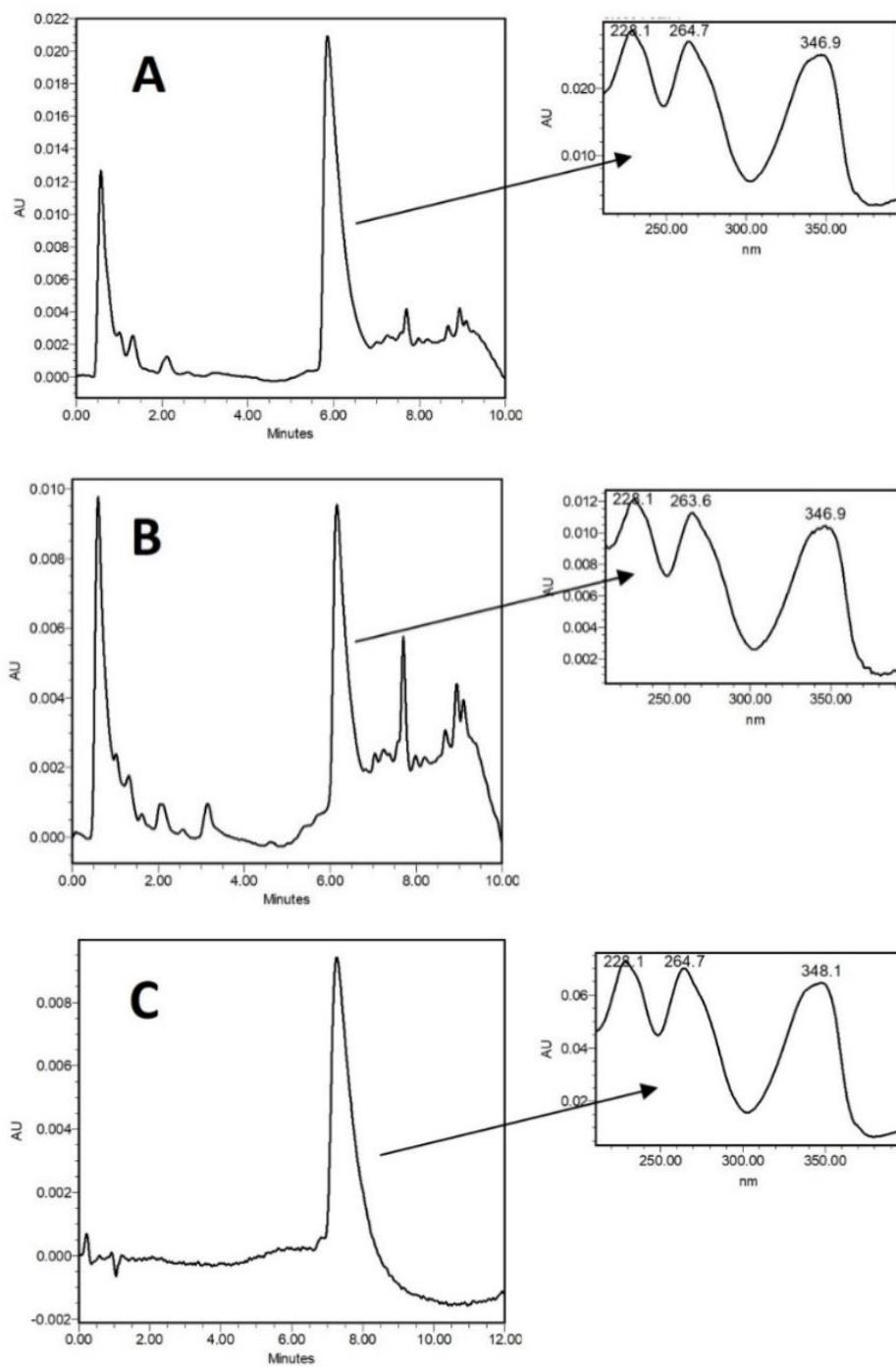


Figura 13. Cromatogramas obtenidos para los extractos crudos AmT (A), AmH (B) y Ber (C).

La fracción activa se analizó por HPLC - MS. El análisis demostró la presencia de patrones de fragmentación y pesos moleculares correspondientes a berberina y jatrorrizina (Fig. 13). Fr4 (AmH 4) se analizó por espectrometría de masas y se encontraron los iones correspondientes a berberina (A, m/z 336) y jatrorrizina (B, m/z 338), estos compuestos se confirmaron mediante MS/MS (Fig. 14). Los espectros de masas obtenidos se muestran en la figura 15. Como puede observarse, al fragmentar el ion m/z 336, correspondiente al ion cuaternario de la berberina ($[M]^+$) se observaron iones a m/z 321 ($M-CH_3$), 320 ($M-CH_4$), 304, 306 y 292 ($M-CH_4-CO$). Por su parte, la fragmentación del ion a m/z 338, atribuido a la jatrorrizina cuaternaria ($[M]^+$), generó los iones a 323 ($M-CH_3$), 322 ($M-CH_4$), 306.0 ($M-H-CH_3O$) y 294.0 (M^+H-3CH_3).

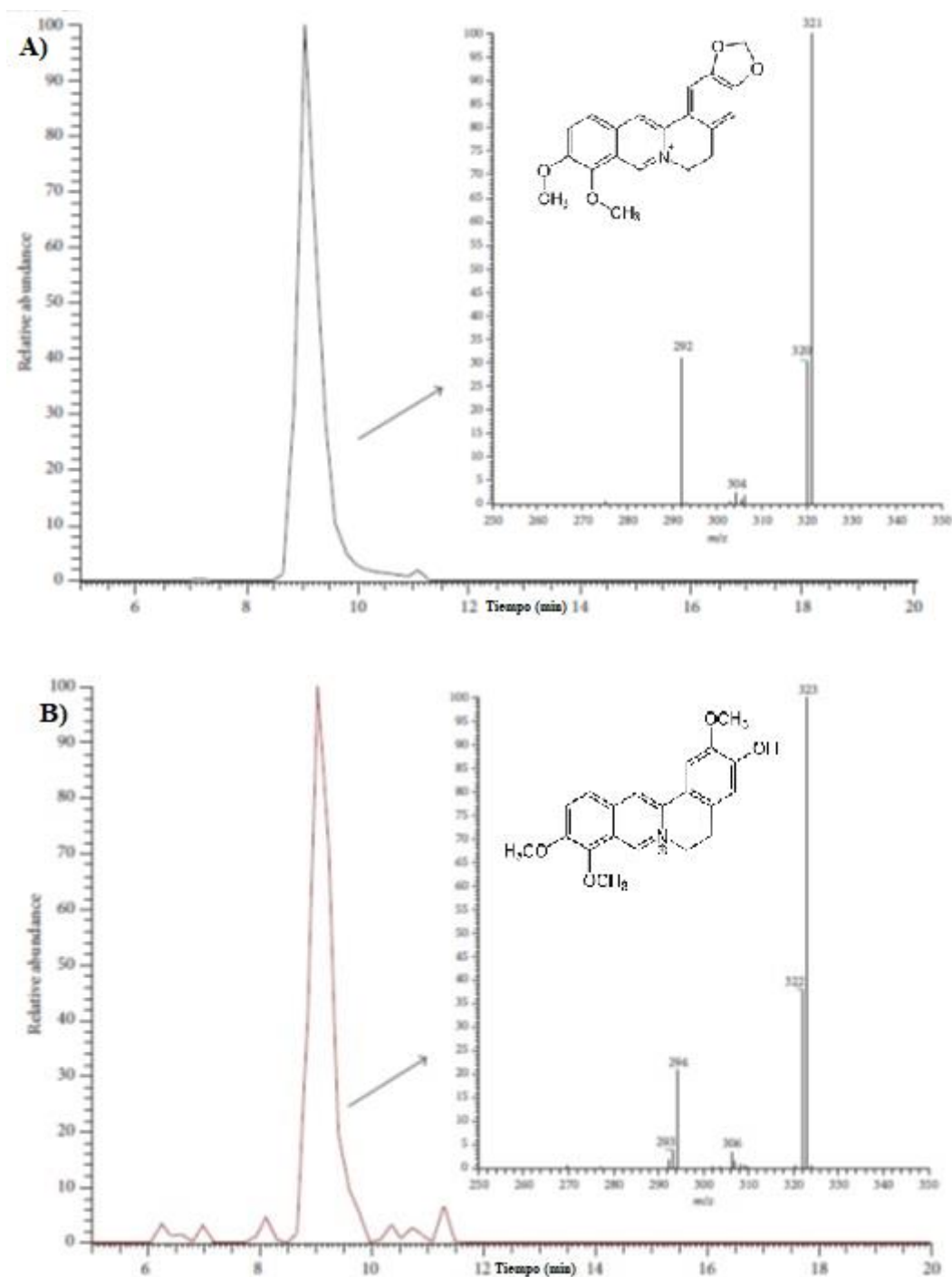


Figura 14. Cromatogramas y espectros de masas obtenidos para la fracción AmH4. Fragmentograma LC-MS / MS y espectros MS / MS obtenidos para A) berberina (m / z 336) y B) jatrorrhizina (m / z 338).

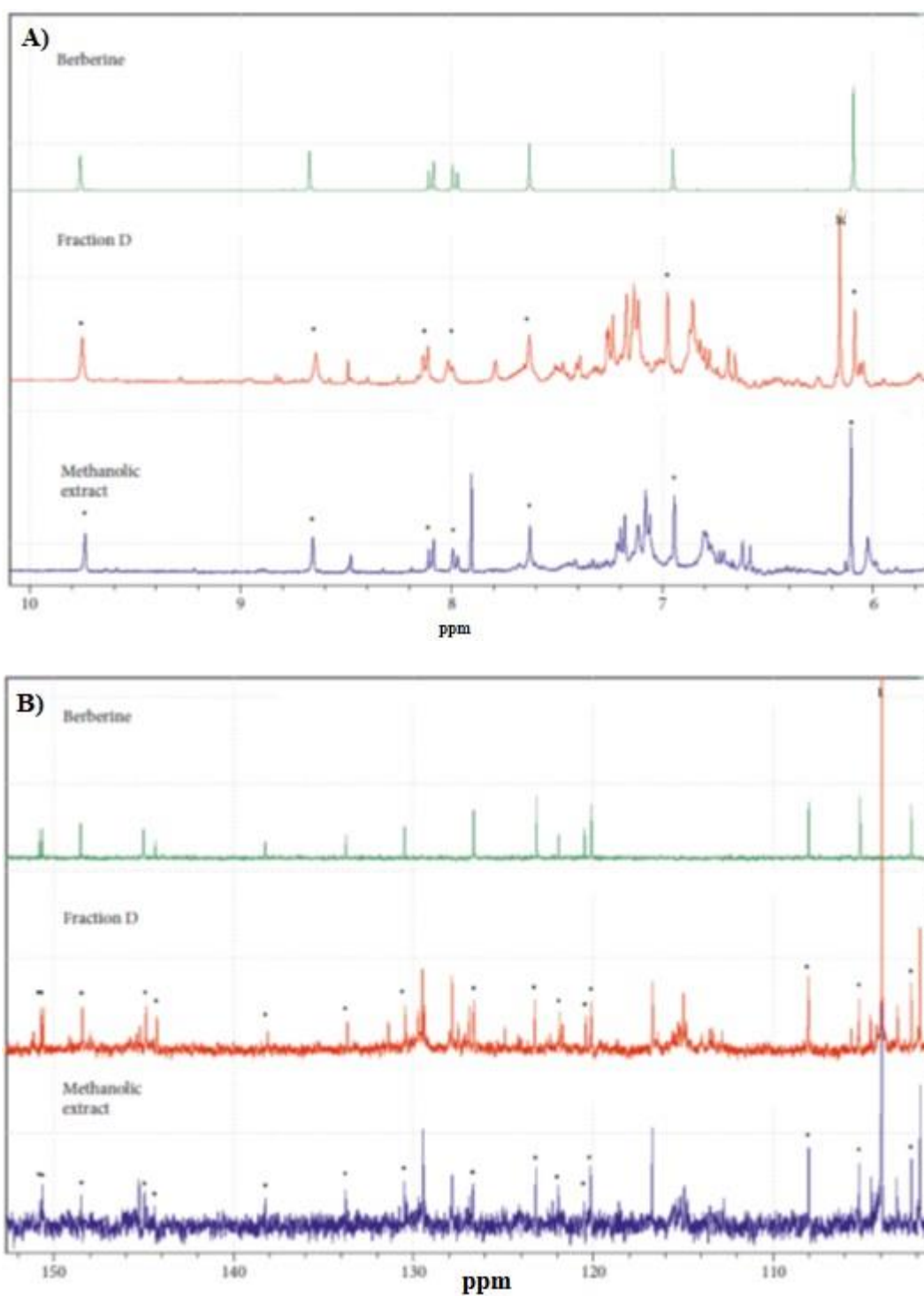


Figura 15. Comparación de los espectros H-NMR (A) y C-NMR (B) de Ber, AmH4 y AmH.

4.6 ACTIVIDAD BIOLOGICA DEL COMPONENTE ACTIVO

Una vez identificado el compuesto activo se evaluó su actividad frente a los parásitos *E. histolytica*, *T. vaginalis*, *S. venezuelensis* y *S. mansoni*. Ber presento IC₅₀ de 3.4, 1.9, 5.8 y 1.7 µM respectivamente. En la tabla 6 se muestra el resultado de Ber, sobre *S. mansoni*, donde se observó que a 5 µg/mL tuvo efecto significativo sobre la viabilidad a las 72 h, y a partir de 10 µg/mL tuvo efecto significativo sobre la viabilidad a partir de las 24 h, a 25 µg/mL a las 48 h y a 50 - 100 µg/mL tuvo efecto a las 24 h (Tabla 6).

Tabla 6. Actividad de berberina frente a vermes adultos de *S. mansoni* en cultivo. Se evaluó en términos de número de parejas juntas (N.P.) parejas separadas (P.S.), porcentaje de motilidad (Mot) de los gusanos, daño del tegumento (D.T.) porcentaje de viabilidad (V) a las 24, 48 y 72 h.

µM	N.P.	24 h				48 h				72 h			
		P.S.	Mot	D.T.	V	P.S.	Mot	D.T.	V	P.S.	Mot	D.T.	V
C –	9	0	100	-	100	0	100	-	100	0	100	-	70.5
C +	9	9	0	++	6	9	0	+++	0.9	9	0	+++	0
Ber 1	9	0	100	-	100	1	100	-	100	1	100	-	100
2.5	9	0	100	-	85.5	1	100	-	76.9	3	75	-	41
5	9	6*	75	+	65	8*	50	+	46.2	8*	25*	+	16.2*
10	9	9*	0*	++	26.5*	9*	0*	++	11.1*	9*	0*	+++	2.6*
25	9	9*	0*	+++	5.1*	9*	0*	+++	0*	9*	0*	+++	0*
50	9	9*	0*	+++	0*	9*	0*	+++	0*	9*	0*	+++	0*
ANOVA p		0.018 < 0.001		0.006		0.02 < 0.001		0.002		0.109 0.001		< 0.001	
F_(6,21)		8.71 43.49		5.89		6.64 78.53		6.13		3.35 36.48		6.54	
IC₅₀				8.76				4.82				1.70	

Daño del tegumento: Ausente -, Presente +, Abundante ++ y Muy abundante +++. * Diferencias estadísticas en comparación con el cultivo de gusanos sin tratar, post hoc HDS de Tukey, $p < 0.001$.

4.7 EVALUACIÓN CITOTÓXICA Y CITOPROTECTORA

La citotoxicidad de los extractos crudos, fracciones, Ber y polímeros fue evaluada mediante la prueba de hemólisis de eritrocitos humanos a distintas concentraciones. En cada tratamiento, el control en PBS no presentó hemólisis detectable y el control con agua destilada presentó un 100 % de hemólisis. La citotoxicidad de los extractos crudos de tallo y hoja de *A. mexicana* y *K. daigremontiana* no muestran ser significativamente citotóxicos ($p < 0.001$) en comparación con el C+, inclusive a 1,000 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de hemólisis (% media \pm DE) causada por los extractos de hojas y tallos de *A. mexicana* y *K. daigremontiana*.

$\mu\text{g/mL}$	EXTRACTOS			
	AmH	AmT	KalH	KalT
C -	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
C +	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0
100	0.29 \pm 0.01*	0.1 \pm 0.0*	0.5 \pm 0.0*	0.3 \pm 0.0*
200	0.79 \pm 0.08*	0.5 \pm 0.1*	0.5 \pm 0.0*	0.50 \pm 0.0*
400	1.17 \pm 0.47*	0.8 \pm 0.2*	2.2 \pm 0.1*	1.2 \pm 0.4*
600	1.70 \pm 0.23*	1.5 \pm 0.3*	4.1 \pm 0.7*	1.7 \pm 0.1*
800	2.11 \pm 0.42*	2.1 \pm 0.1*	5.4 \pm 0.5*	2.1 \pm 0.4*
1,000	2.81 \pm 0.35*	2.3 \pm 0.5*	7.2 \pm 0.5*	2.8 \pm 0.6*
ANOVA p	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
$F_{(3,68)}$	0.6	3.3	7.5	6.0

*Diferencias estadísticamente significativas comparado con control positivo (C+), *post hoc* HDS de Tukey, $p < 0.001$.

La actividad citotóxica y citoprotectora del extracto crudo con mejor efecto antiparasitario (Am), así como la subfracción más activa (AmH4) y el metabolito (Ber) identificado en dicha subfracción se evaluaron (Tabla 8) en comparación con el control positivo el cual produce hemólisis total. El extracto Am y la fracción AmH4 no mostraron actividad hemolítica significativa ($p < 0.001$) en todas las concentraciones probadas, en comparación con C+. La berberina resultó hemolítica a partir de la concentración de 600 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Am presentó citoprotección en todas las concentraciones evaluadas. Sin embargo, AmH4 solo presentó citoprotección significativa ($p < 0.001$) a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La berberina actúa al contrario que Am, pues no presentó citoprotección significativa en ninguna de las concentraciones evaluadas.

Tabla 8. Porcentajes (media \pm DE) de hemólisis y citoprotección del extracto de *A. mexicana* (Am), la fracción AmH4 y berberina (Ber).

$\mu\text{g}/\text{mL}$	TRATAMIENTOS					
	HEMÓLISIS			CITOPROTECCIÓN		
	Am	AmH4	Ber	Am	AmH4	Ber
C -	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	100 \pm 0.01	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0
C +	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
100	0.29 \pm 0.01*	0.12 \pm 0.04*	2.79 \pm 0.41*	23.56 \pm 3.47*	29.81 \pm 2.43*	1.55 \pm 0.01
200	0.79 \pm 0.08*	0.43 \pm 0.11*	11.80 \pm 1.43*	76.95 \pm 2.31*	4.83 \pm 0.31	3.50 \pm 0.12
400	1.17 \pm 0.47*	0.78 \pm 0.01*	23.83 \pm 3.24*	99.10 \pm 1.34*	4.21 \pm 0.19	2.56 \pm 0.01
600	1.70 \pm 0.23*	1.49 \pm 0.31*	55.92 \pm 4.13	99.30 \pm 0.22*	2.85 \pm 0.29	0.79 \pm 0.05
800	2.11 \pm 0.42*	2.11 \pm 0.22*	72.88 \pm 2.26	99.33 \pm 0.05*	1.64 \pm 0.04	0.89 \pm 0.06
1,000	2.81 \pm 0.35*	2.31 \pm 0.27*	90.16 \pm 9.28	99.73 \pm 3.06*	0.59 \pm 0.08	0.09 \pm 0.05
ANOVA p	< 0.05	< 0.05	< 0.001	0.001	< 0.05	< 0.05
$F_{(6,21)}$	3.87	3.87	17.177	61.46	35.89	3.86

*Diferencias estadísticamente significativas comparado con control positivo (C+), *post hoc* HDS de Tukey, $p < 0.001$.

4.8 ANALISIS BIOINFORMÁTICO

La estructura cristalina de rayos X de la molécula Ber fue descargada de PubChem, código CID 2353 (Fig. 16A). La estructura cristalina de rayos X del complejo tubulina-colchicina fue descargada de PDB (PDB code 4o2b, resolución de 3,58 Å]. Esta estructura es un tetrámero que contiene dos subunidades α -tubulina (A y C) y dos subunidades β -tubulina (B y D) dispuestas de forma alterna. La proteína se preparó separando las subunidades de A, C de la α -tubulina y D de la β -tubulina. También se eliminaron los heteroátomos como la colchicina, el GTP y el PIB. Se realizó un paso de minimización de energía para esta estructura de la β -tubulina modificada (Fig. 16B), usando el software SPDBV versión 4.10 para reparar las geometrías distorsionadas. El acoplamiento molecular se realizó mediante Autodock 4.0. Chems sketch se utilizó para crear estructuras tridimensionales limpias de berberina en formato de archivo MOL (Fig. 16C). OpenBabel se utilizó para convertir los archivos MOL en archivos PDB. Se utilizó el módulo Autodock para procesar y preparar la molécula y proteína. Brevemente, se agregaron a la proteína hidrógenos polares, cargas de Kollman (Fig. 16D). Las operaciones de acoplamiento se realizaron manteniendo el receptor como rígido y el ligando como una molécula flexible. Los parámetros de cuadrícula y Dock se mantuvieron constantes para todas las ejecuciones. Un algoritmo genético lamarckiano de 100 interacciones se repitió 15 veces independientes, y los resultados se agruparon con una distancia cuadrática media (RMSD) de 2.00 Å. Los resultados se analizaron a partir del gráfico de agrupamiento. Los grupos se compararon en función del tamaño del grupo y la energía de unión. El grupo con el mayor número de confirmaciones y la energía de enlace más baja se seleccionó como el grupo más favorable. La conformación y la energía de unión se analizaron con AutoDock Tools 1.5.6 y Chimera 1.9 ambos para Windows (Fig 16E).

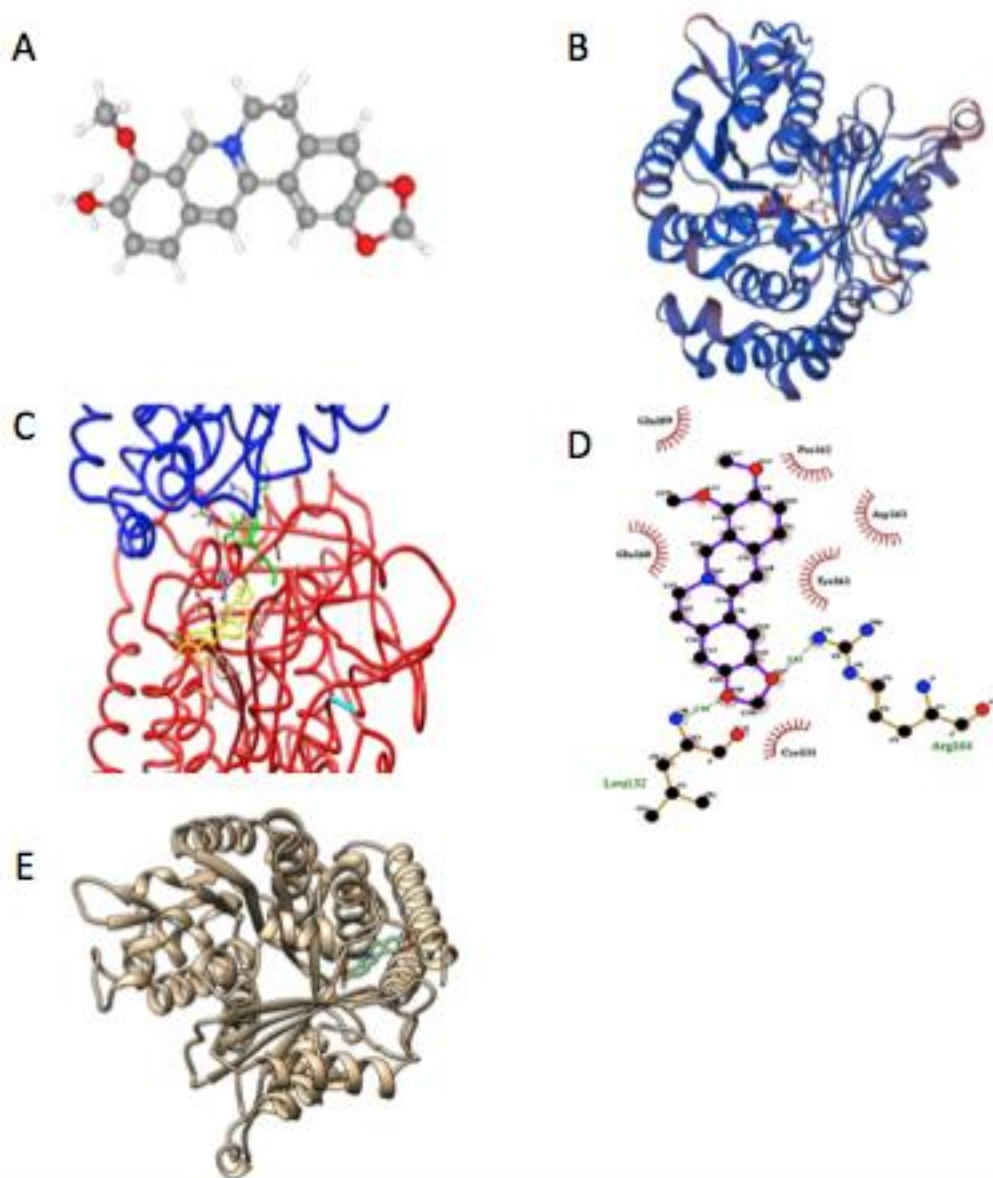


Figura 16. Estructuras *in-silico* en 3D del acoplamiento molecular de berberina y la subunidad β -tubulina. A) Modelo en 3D de berberina (PubChem CID:2353). B) Modelo en 3D *in-silico* de β -tubulina. C) Superposición de la conformación acoplada final de berberina (amarillo) con la conformación de unión determinada por cristalografía de colchicina (verde) en el heterodímero de β -tubulina. D) Residuos de interacción involucrados en las interacciones Ber- β -tubulina. E) Acoplamiento molecular final de Ber en β -tubulina. Sitio de unión similar al de la colchicina.

4.9 PREPARACION DE LAS NP

Para la preparación de las nanopartículas poliméricas “NP” a base de los polímeros Eudragit® (EPO, E100, L100 y L100-55), se compararon variables que podrían afectar en su formulación (Fig. 17). Las variables que se evaluaron en los 4 polímeros Eudragit® utilizados, fueron: Fase orgánica “FO”, Fase acuosa “FA”, Masa polímero “MP”. Esto en busca de una distribución de tamaños monomodal y monodispersa.

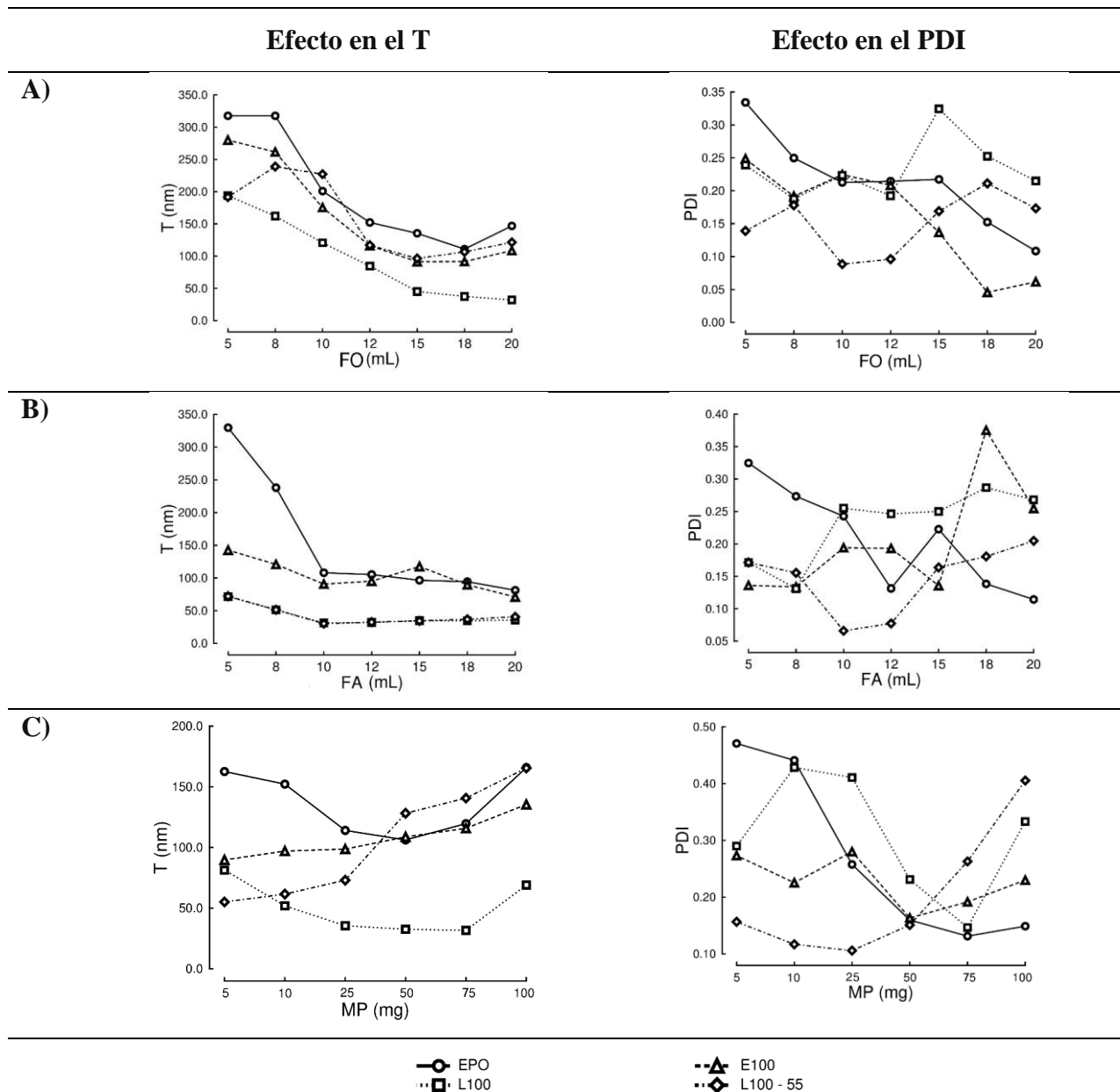


Figura 17. Formulaciones de las NP. Las combinaciones para la determinación del T y PDI fueron: A) Efecto del volumen de FO (50 mg MP + 12 mL FA). B) Efecto del volumen de FA (50 mg MP + 12 mL FO). C) Efecto de la MP (12 mL FO + 12 mL FA). Cada punto mostrado en la figura representa la media en 3 experimentos diferentes.

4.10 EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS

La citotoxicidad de las NP se realizó mediante la técnica de hemólisis, los cuales no fueron significativamente hemolíticos al ser comparados con el control positivo. Ninguna de las formulaciones de NP a base de los polímeros evaluados mostró ser citotóxica (Tabla 9).

Tabla 9. Porcentaje de hemólisis (% media \pm DE) causada por los formulados de NP con los polímeros EPO, E100, L100 y L100-55.

POLÍMEROS				
$\mu\text{g/mL}$	EPO	E100	L100	L100-55
C -	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
C +	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
100	$0.013 \pm 0.002^*$	$0.013 \pm 0.004^*$	$0.029 \pm 0.007^*$	$0.012 \pm 0.002^*$
200	$0.016 \pm 0.002^*$	$0.014 \pm 0.002^*$	$0.041 \pm 0.012^*$	$0.016 \pm 0.002^*$
400	$0.018 \pm 0.001^*$	$0.017 \pm 0.002^*$	$0.042 \pm 0.010^*$	$0.017 \pm 0.004^*$
600	$0.019 \pm 0.002^*$	$0.017 \pm 0.003^*$	$0.043 \pm 0.007^*$	$0.019 \pm 0.001^*$
800	$0.020 \pm 0.004^*$	$0.018 \pm 0.001^*$	$0.045 \pm 0.005^*$	$0.020 \pm 0.009^*$
1,000	$0.025 \pm 0.003^*$	$0.021 \pm 0.005^*$	$0.048 \pm 0.005^*$	$0.023 \pm 0.006^*$
ANOVA <i>p</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<i>F</i> (2,15)	17.235	8.795	4.387	0.933

*Diferencias estadísticamente significativas comparado con control positivo (C+), *post hoc* HDS de Tukey, $p < 0.001$.

4.11 ENCAPSULACIÓN DEL COMPUESTO ACTIVO

Una vez que se identificó el componente activo, se procedió a encapsularlo. Para esto seleccionamos las mejores formulaciones en el experimento anterior, con los 4 diferentes polímeros donde se determinó el efecto de las diferentes variables sobre el T de partícula y PDI. Se realizó un barrido con berberina, grado estándar. Como blanco se utilizó MeOH, y se encontró su longitud de onda máxima de absorción a 375 nm. Después se realizó la curva de calibración (Fig. 18).

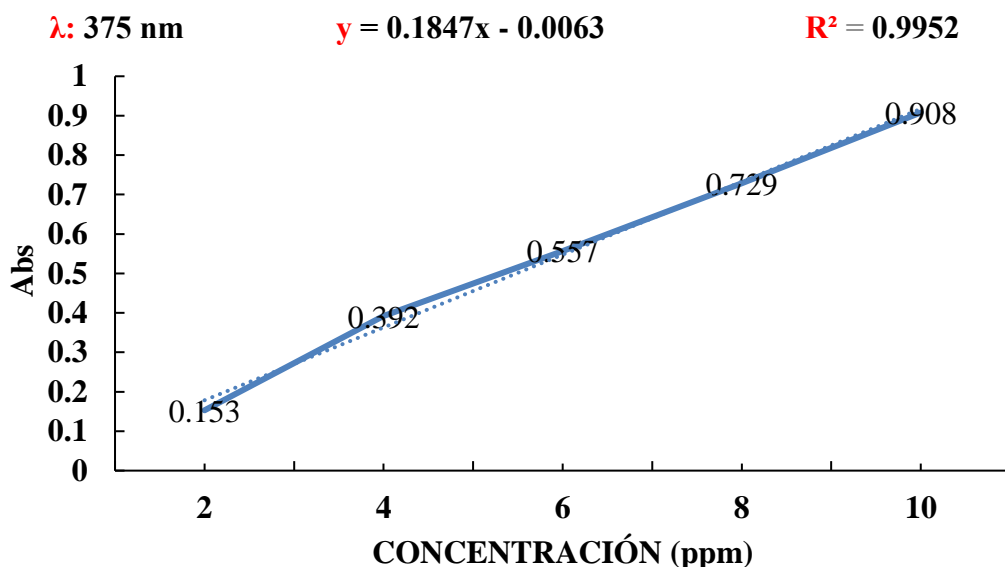


Figura 18. Curva de calibración del alcaloide Berberina en metanol.

Finalmente se realizó la nano-encapsulación y se determinó el tamaño, PDI y porcentaje de eficiencia de encapsulación (Tabla 10). Se compararon los polímeros sin encapsular con los polímeros con el alcaloide berberina encapsulada. Se observa que los tamaños y los PDI son idóneos en los 4 polímeros, pero la eficiencia varía, siendo EPO el más eficiente con 72.3 % de eficiencia de encapsulación y L100-55, el menos eficiente con 17.6 %. Las Imágenes tomadas por el SEM, indican que las NP, poseen estructura esférica (Fig. 19) y

nanométrica, además presentaron PDIs idóneos tal como lo indicaba el estudio realizado con el Nano-Sizer.

Tabla 10. Determinación de tamaño (nm), polidispersidad (PDI) y porcentaje de eficiencia de encapsulación (% EE) de nanopartículas cargadas con berberina idóneos con polímeros EPO, E100, L100 y L100-55 en tres mediciones a distintos tiempos.

Polímeros	nm	PDI	% EE
EPO	100.2	0.1	-
EPO + Ber	150.6*	0.14*	72.31
ANOVA <i>p</i>	< 0.001	0.002	
<i>F</i>_(5,28)	35.8	3.86	
E 100	188.4	0.17	-
E 100 + Ber	200.1*	0.19	38.47
ANOVA <i>p</i>	0.01	0.005	
<i>F</i>_(5,28)	17.18	5.1	
L 100	33.8	0.11	-
L 100 + Ber	72.26*	0.16*	47.12
ANOVA <i>p</i>	< 0.001	< 0.001	
<i>F</i>_(5,28)	1.65	3.87	
L 100-55	112.7	0.08	-
L 100-55 + Ber	168.2*	0.13*	17.64
ANOVA <i>p</i>	0.001	< 0.001	
<i>F</i>_(5,28)	16.7	5.2	

Diferencias significativas entre los polímeros cargados con Ber y los polímeros sin carga, *post hoc* HDS Tukey $p < 0.001$.

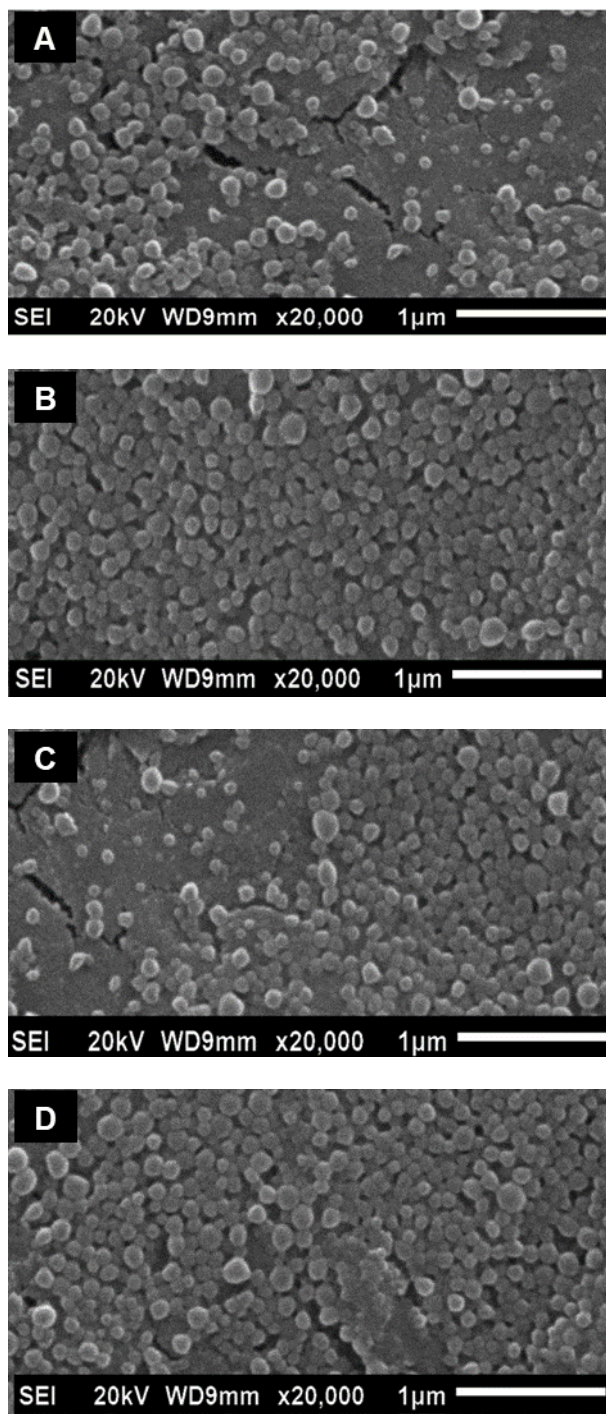


Figura 19. Morfología de las nanopartículas poliméricas cargadas con berberina vía SEM.

A: EPO, **B:** E100, **C:** L100 y **D:** L100-55. Se muestran sus estructuras esféricas a 20,000 x de aumento a 20kV.

5 DISCUSIÓN

Los productos naturales provenientes de plantas representan una gran fuente de metabolitos con diversas propiedades biológicas las cuales poseen principios activos para el tratamiento de enfermedades. El uso terapéutico de las plantas medicinales es base fundamental para el descubrimiento y desarrollo de nuevos principios activos, debido a que contienen metabolitos con propiedades biológicas diversas (Patel, Patel, & Patel, 2011). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, al hacer referencia a la medicina popular se incluye la medicación a base de hierbas (White, Whiley, & Ross, 2019). Sin embargo, el uso de plantas no solo aparece hoy en día en la medicina popular, sino que incluso se ha acuñado el término de “Farmacia Verde”, entendida como aquella tarea referida al procesamiento y transformación de las plantas medicinales (Zarei, Changizi-Ashtiyani, Taheri, & Ramezani, 2015). Sin embargo, en el momento actual el desarrollo de medicamentos de última generación se concede gran interés a los vectores farmacéuticos nanoparticulados que permiten mejorar el acceso de los medicamentos consolidados al punto de acción e incluso aprovechar moléculas anteriormente desechadas al mejorar su aplicación.

En este estudio se evaluó la actividad en contra de distintos parásitos, de los extractos metanólicos de hojas y tallos de *A. mexicana* y *K. daigremontiana* así como de las fracciones de estos mismos, obtenidos por partición con solventes de distinta polaridad. Entre los parásitos estudiados se encuentran *E. histolytica* (coloniza intestino delgado) y *T. vaginalis* (coloniza tracto genitourinario), se les han denominado parásitos de las mucosas; el fármaco de elección para tratar dichos parásitos es el metronidazol (Pal et al., 2009). Sin embargo, se ha reportado la resistencia a dicho fármaco por parte de *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis*, esto podría deberse a una reducción de la actividad o alteración mutagénica de la enzima piruvato ferredoxin oxidoreductasa (Cudmore, Delgaty, Hayward-McClelland, Petrin, & Garber, 2004).

IV y PZQ, desde que fueron introducidos para tratar la estrongiloidosis y esquistosomiasis respectivamente, se les considera los fármacos de elección para el tratamiento de estas parasitosis (von Samson-Himmelstjerna, 2012). También se ha informado sobre cepas de nematodos resistentes en el pastoreo de ganado y el problema de la disminución de la

susceptibilidad en los nematodos humanos o la posibilidad de resistencia también está aumentando (Parasitol & Article, 2013). Se ha observado un fracaso del tratamiento intravenoso en pacientes coinfectados con el virus T-linfotrópico humano-1 y *S. stercoralis* y también se han informado eventos adversos relacionados con genotipos humanos sensibles a *S. mansoni* (Bourguinat et al., 2010). Estas situaciones hacen que la identificación de quimioterapias alternativas sea un tema de alta prioridad.

5.1 Rendimiento y estudio de compuestos

Los resultados básicos del estudio fitoquímico de los extractos crudos muestran, que tanto para AmH y AmT se detectó la presencia de insaturaciones, quinonas, esteroides, triterpenos, grupos fenólicos, saponinas, flavonoides, carbohidratos y alcaloides, coincidiendo con lo esperado ya que los alcaloides son los compuestos que destacan en *A. mexicana* (Sharanappa & Vidyasagar, 2014). Los rendimientos de extracción por maceración fueron del 10-13 % para las hojas y tallos secos de *A. mexicana*. Estos resultados son similares a los publicados previamente, donde trabajaron con extracto de la planta completa y obtuvieron un rendimiento del 10.7 y del 9.9 % respectivamente (S. Singh & Taylor, 2010). Para el caso de *K. daigremontiana* el rendimiento fue del 10.0 % y 12.7 %. No existen estudios previos. Los resultados del estudio fitoquímico básico de los extractos crudos, tanto para AmH como para AmT, detectó la presencia de esteroides, triterpenos, quinonas, taninos, saponinas, carbohidratos, alcaloides y flavonoides. Concuerda con lo esperado ya que los alcaloides son los compuestos que destacan por su presencia (Sharanappa & Vidyasagar, 2014). Estos resultados son similares a lo reportado anteriormente, donde se menciona la presencia de terpenoides, flavonoides, alcaloides, terpenos, compuestos alifáticos de cadena larga y pocos compuestos aromáticos que son otros constituyentes de esta planta. Para el caso de *K. daigremontiana* los extractos mostraron respuesta positiva para la presencia de insaturaciones, quinonas, triterpenos - esteroides, saponinas, flavonoides y carbohidratos. Se debe tomar en cuenta que la composición química de la planta puede diferir de acuerdo con las partes usadas de la misma, así como la temporada de cosecha y zona geográfica (Xiao et al. 2015).

5.2 Eficacia de los extractos

Para llevar a cabo la evaluación de la actividad del extracto fue necesario determinar previamente el tiempo requerido para alcanzar la fase logarítmica de crecimiento de *E. histolytica* y *T. vaginalis*. Para ello, se realizó una cinética de crecimiento para cada uno. En el caso de *E. histolytica* se determinó un tiempo de generación de 6.3 h y tiempo de duplicación de 4.3 h y a las 72 h entra en su fase exponencial. Para *T. vaginalis* se determinó un tiempo de generación de 7 h y tiempo de duplicación de 4.8 h y 48 h entrando en su fase exponencial. Esta fase es importante, ya que se caracteriza por la duplicación celular y se encuentra en su fase metabólica más activa, alcanzándose en 24 h (Pires-Santos, Santana-Anjos, & Vannier-Santos, 2012). (Lauria-Pires *et al.*, 1997). Los tiempos obtenidos en este trabajo concuerdan con los reportados previamente para estas mismas cepas (Mata-Cárdenas *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos en los ensayos *in-vitro* de actividad sobre el crecimiento de trofozoítos de *E. histolytica* y *T. vaginalis*, las L3 de *S. venezueliensis* y los adultos de *S. mansoni* con los extractos metanólicos de hoja y tallo de ambas plantas se evaluaron con un control negativo que consistió en medio de cultivo con DMSO al 5 % para disolver el extracto y un control positivo que consistió en utilizar en el medio de cultivo un inóculo con el fármaco de referencia.

Los extractos de Am son mejores (en contra de los cuatro parásitos evaluados), tanto para AmH como para AmT, en comparación con los extractos de *K. daigremontiana*. Cuando se realizaron los ensayos de viabilidad de AmH y AmT, la inhibición fue total frente a los cuatro parásitos, a las concentraciones de 500 a 1000 µg/mL, pues la inhibición mostrada por ambos extractos fue mayor al 97 % a estas concentraciones y conforme se disminuían las dosis, la viabilidad se veía aumentada. Sin embargo, AmH resultó ser más efectiva que AmT. Cuando se determinó la concentración inhibitoria media de AmH, las IC₅₀ resultaron estar por debajo de 100 µg/mL, también se realizó la IC₅₀ para el Met e IV. Estas concentraciones son relevantes si se considera que se está evaluando extractos completos crudos sin fraccionamiento o purificación. Es importante mencionar que aunque no hay reportes del uso de extractos de las plantas evaluadas en contra de los parásitos estudiados, solo existen algunos estudios que analizan extractos de esta familia de plantas contra otros microorganismos, incluyendo parásitos como *Leishmania amazonensis*, *Leishmania chagasi* o incluso actividad insecticida frente a *Bombyx mori* (Costa, Muzitano, Camargo, & Coutinho, 2008; El Abdellaoui *et al.*, 2010).

El presente estudio proporciona las primeras ideas sobre el potencial quimioterapéutico de Am y Kal contra *S. venezuelensis* (L3) y *S. mansoni* en un modelo *in-vitro*. Se evaluaron las concentraciones letales efectivas del extracto de *A. mexicana* y *K. daigremontiana* para determinar su actividad antihelmíntica. Estos resultados, indican que AmH y AmT tienen una acción potente a través de la modulación de la respuesta inmune sin tener efectos secundarios dañinos para los eritrocitos humanos. Aunque el mecanismo de acción a través del cual *A. mexicana* mata a dichos nematodos aún no se ha identificado, un estudio ha puesto de manifiesto que la berberina, el cual es el componente principal de *A. mexicana*, puede tener un efecto en la intercalación del ADN parasitario (Wells, 2011). Existen estudios sobre Berberina que mencionan que exhibe un efecto potencial frente a bacterias, hongos, virus, nematodos y parásitos (Brahmachari, Gorai, & Roy, 2013a). En 2011 se encontró que el extracto acuoso de hojas de *A. mexicana* exhibe actividad antihelmíntica significativa contra *Ascaridia galli* y *Pheritima posthuma* a concentraciones de 6.25 a 100 mg/mL (Onguéné et al., 2014). También se ha demostrado la capacidad antimalárica contra *P. falciparum*, ya que el extracto acuoso de las partes aéreas de esta planta exhibe una CI_{50} de 5,89 $\mu\text{g/mL}$ (Adebayo & Krettli, 2011).

Cuando la actividad de las fracciones fue evaluada, las fracciones AmH3 y H4 presentaron buen porcentaje de letalidad media (tabla 5). Estas fueron 66.1 y 39.8 para el caso de *E. histolytica*, 69.2 y 55.7 para *T. vaginalis* y para *S. venezuelensis* 44.7 y 15.1 respectivamente. Dichas fracciones fueron catalogadas como las más prometedoras, aunque Fr.4 fue la más activa. Está documentado que la evaluación de extractos fraccionados presenta mejor actividad y existen ejemplo con diferentes plantas (Davoodi & Abbasi-Maleki, 2018). Esto, sumado al comportamiento dosis-respuesta obtenido, permite suponer que existen metabolitos en *A. mexicana* que inhiben el crecimiento de varios protozoarios y dichas moléculas pueden ser solubilizadas en una amplia gama de polaridad de solventes, los cuales se concentran ligeramente en la fracción con polaridad baja. Entre las moléculas que cumplen estos criterios, se han reportado metabolitos aislados como la berberina, coptisina, entre otros alcaloides y flavonoides como quercetina y quercitrina que han mostrado actividad leishmanicida con CI_{50} menor a 1 $\mu\text{g/mL}$ (Muzitano, Cruz, et al., 2006).

Los alcaloides encontrados en las fracciones AmH3 y H4, son quizá los responsables de la actividad biológica, ya que se ha atribuido su efectividad cuando están presentes en extractos de plantas que se han evaluado frente a *G. lamblia*, *E.*

histolytica e incluso contra *T. vaginalis* (Birdsall & GS, 1997). Se ha reportado que la berberina posee varios efectos farmacológicos y actividad contra una variedad de bacterias, hongos, protozoos, helmintos y virus (Applications, Diarrhea, & Parasites, 2000). Además, se ha podido demostrar que cuando la berberina esta mezclada con otros alcaloides es más efectiva (B. Singh, Srivastava, Khosa, & Singh, 2001). También, se ha demostrado que el sulfato de berberina posee actividad inhibitoria contra *G. lamblia*, *T. vaginalis* y *E. histolytica* en cultivos axénicos, observándose cambios morfológicos en los parásitos expuestos a este alcaloide donde causó un agrupamiento de la cromatina en el núcleo, formación de vacuolas autofágicas y agregados de pequeñas vacuolas en el citoplasma (Alkaloid, 1990). Por otro lado el alcaloide jatrorrizina ha sido aislado en plantas como *Enantia chlorantha* y *A. mexicana* (S. Singh & Taylor, 2010), observando su actividad antimicrobiana y antifúngica (Zamilpa, J. et al. 2017) . Además, en ensayos *in vitro* ha mostrado ser eficaz frente a *P. falciparum*, *L. donovani* y *T. b. rhodesiense* (Malebo et al., 2013; Willcox et al., 2007). Li y colaboradores encontraron que los derivados de jatrorrhizina tenían efectos antimicrobianos mucho más fuertes que la propia jatrorrizina pura (Li et al., 2015).

Nuestros resultados indican que Ber reduce significativamente la viabilidad de los 4 parásitos estudiados. La actividad proapoptótica de Ber abre la posibilidad de una combinación de medicamentos que podrían promover una acción sinérgica o minimizar la posibilidad de resistencia a los medicamentos (Panic, Duthaler, Speich, & Keiser, 2014). Por lo tanto, los nuevos candidatos a fármacos también pueden ser eficaces contra vermes adultos (Tritten, Silbereisen, & Keiser, 2011). Aunado a esto, el alcaloide Ber podría ofrecer ventajas como antiparasitario para el tratamiento de pacientes con estrongiloidosis coinfectados con *E. hystolitica*, *Leishmania* spp. o infecciones con *P. falciparum* (Raghav et al., 2017; Wright et al., 2000).

En esta investigación, pudimos observar el efecto positivo de Ber contra L3 de *Strongyloides venezuelensis* y contra adultos de *S. mansoni in-vitro*, con resultados muy similares a los obtenidos con los fármacos de referencia contra estas helmintosis como la ivermectina o el praziquantel. Se deben realizar estudios *in vivo* para abordar el uso de Am, fracciones y Ber como tratamiento alternativo o preventivo frente a estas parasitosis. Las extracciones mediante particiones a partir de un extracto crudo con solventes de diferentes polaridades son comunes para la extracción de distintos componentes, ya que es posible

extraerlos para después purificar e identificar mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas. En el caso de extractos de *A. mexicana*, se han encontrado metabolitos derivados de la berberina con actividad biológica en contra de la línea celular SW480 de cáncer de colon humano, mediante extracción y purificación a partir del extracto metanólico, entre las cuales destacaron las fracciones clorofórmicas y metanólicas (Singh *et al.*, 2016). Asimismo, derivados de la berberina han mostrado efecto frente a *Plasmodium berghei* en modelo murino (Pires, 2009). Estos estudios son relevantes, debido a que no existen reportes del uso de extractos de *A. mexicana* en contra de los diferentes parásitos evaluados en este proyecto.

El alcaloide natural berberina se ha empleado en medicina china y mexicana durante cientos de años con una amplia gama de efectos farmacológicos y bioquímicos (Tillhon, Guamán Ortiz, Lombardi, & Scovassi, 2012). Ber está presente en una amplia variedad de plantas medicinales como *Berberis aristata*, *Berberis vulgaris*, *Coptis chinensis* y *A. mexicana*. Estos alcaloides son un grupo de moléculas que han demostrado una amplia variedad de funciones biológicas y también han sido analizadas contra diferentes microorganismos (Rajvaidhya & Pradesh, 2012). Investigaciones recientes respaldan que la berberina tiene efectos anticancerígenos al bloquear la proliferación y destruir las células cancerosas (Tillhon *et al.*, 2012). Hasta el momento no se han realizado estudios sobre el uso de *A. mexicana* o Ber para el tratamiento de la estrongiloidosis o esquistosomiasis, aunque hay evidencia de que Ber es activo contra infecciones por filarias causadas por *Brugia malayi*, *Wuchereria bancrofti* y *Onchocerca volvulus* (Rana & Misra-Bhattacharya, 2013). Además, se han evaluado cuatro compuestos naturales (cloruro de berberina, cloruro de coptisina, cloruro de palmatina y nitrato de deshidroclordalina) mostrando su actividad antipalúdica contra *P. falciparum* (CI₅₀ <50 nM), y su baja citotoxicidad (viabilidad celular > 90 %) (Nonaka *et al.*, 2018).

Finalmente, mediante HPLC-DAD se pudo encontrar el perfil cromatográfico con tiempo de retención de berberina, así como un espectro de absorción muy parecido al de este alcaloide. Estos resultados concuerdan con otras investigaciones que estudian la presencia de estos alcaloides en hojas de *A. mexicana* a partir de extractos metanólicos (Brahmachari *et al.*, 2013a; S. Singh *et al.*, 2016). En relación a esto, pruebas fitoquímicas realizadas anteriormente han revelado la presencia de varios alcaloides en la planta, entre los cuales destacan además de berberina y jatrorrizina, protopina, alocriptofina y sanguinarina (Xooltamayo, Monforte-gonzález, Rubio-piña, Mirón-lópez, & Vázquez-flota, 2017). La fracción

activa AmH3 se analizó por espectrometría de masas. Las señales con mayor intensidad fueron los iones atribuidos a Ber (m/z 336) y jatrorrizina (m/z 338) y se confirmaron mediante MS/MS, ya que al fragmentar el ion m/z 336, correspondiente a Ber (a), se observaron iones a m/z 321 (M-CH₃), 320 (M-CH₄), 304, 306 y 292 (M-CH₄-CO), a m/z 338, atribuido a la jatrorrizina (b), generando los iones a 323 (M-CH₃), 322 (M-CH₄), 306.0 (M-H-CH₃O) y 294.0 (M⁺H-3CH₃). Estos patrones de fragmentación confirman la presencia de berberina y jatrorrizina (Grycová, Dostál, & Marek, 2007; Liu et al., 2011; Tang et al., 2014).

En cuanto a los ensayos realizados con los extractos de *K. daigremontiana*, se conoce que esta planta posee una actividad antimicrobiana *in-vitro* frente a las especies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y también reportaron la presencia de actividad antifúngica en estudios *in vitro*, con un extracto acuoso de hojas de la planta. Patil, et al., (Patil, Dongare, Kulkarni, Joglekar, & Arvindekar, 2013) mostraron el efecto antidiabético del extracto de diclorometano de la *Kalanchoe pinnata* en ratas. Las ratas se volvieron diabéticas con estreptozotocina. Dicha fracción disminuyó la glucemia de 228 mg/dl a 116 mg/dl. En un estudio *in vitro*, el extracto en acetona de *K. pinnata*, mostró actividad antiviral frente a los virus HSV 1 y HSV 2 (Ürményi et al., 2016). La importancia de algunos flavonoides sobre la actividad antileishmania de *Kalanchoe* se demostró previamente por el aislamiento de quercitrina, un potente flavonoide contra la leishmaniosis (Muzitano, Tinoco, et al., 2006). En 1995, Da Silva y col., investigaron el efecto de un extracto vía oral de *K. pinnata* sobre ratones BALB/c que fueron infectados con *Leishmania amazonensis*, observando un retraso significativo en la aparición de la enfermedad en comparación con los ratones no tratados o aquellos que la recibieron por vías intravenosa o tópica (Da Silva et al., 1995). Se encontró que dosis de 8 mg prevenían el crecimiento del parásito, comparable al fármaco de elección para leishmaniosis como el Glucantime (Moniuszko-Szajwaj, Pecio, Kowalczyk, & Stochmal, 2016). Las plantas del género *Kalanchoe* (*Crassulaceae*) son fuentes importantes de glucósidos cardíacos bufadienólicos, estos metabolitos pueden causar envenenamiento y afectar el musculo cardiaco de mamíferos en altas concentraciones, también pueden causar una intoxicación que afecta al sistema nervioso y muscular de animales pequeños, en particular (Moniuszko-Szajwaj et al., 2016).

5.3 Toxicidad

Estos estudios se realizan para evaluar la toxicidad del material vegetal en diferentes estirpes celulares. La citotoxicidad de los extractos crudos de tallos y hojas de ambas plantas fue evaluada mediante la prueba de hemólisis de eritrocitos humanos. Se pudo observar que ninguno de los extractos mostró ser significativamente citotóxico. El control positivo negativo no presentó hemólisis detectable y el control positivo que consistió en agua destilada presentó un 100 % de hemólisis. En este estudio también se evaluó la toxicidad de la fracción activa y de Ber, a diferentes concentraciones. Los extractos no resultaron tóxicos, siendo su toxicidad de aproximadamente para el caso de KalH 7.4 % en su concentración más alta y con una toxicidad casi nula en la concentración más baja. En el caso de AmH a la concentración más alta ensayada se encontró que el extracto de hoja presenta una hemólisis del 2.8 %, y la provocada por el extracto de tallo del 2.3 %. Para las concentraciones más bajas, la hemólisis presentada en los eritrocitos fue del 0.3 y 0.1 % respectivamente, esto conforme al criterio reportado en 2011 por Karimi, (Karimi, et al, 2011). Pero para el caso de Ber, si se observa un aumento de la toxicidad conforme va aumentando la concentración, ya que a 100 µg/mL presenta 2.8 % de hemólisis y a 1000 µg/mL presenta 90.1 % de hemólisis. En el presente estudio, la concentración evaluada para las dosis necesarias para los ensayos biológicos se podría considerar no tóxica, ya que según el criterio de Karimi et al. establece que una lisis menor a 6 % a 0.1 mg/mL, es de baja toxicidad, y menciona que la hemólisis podría ser por el estrés mecánico de la agitación. Algunos ejemplos reportados son los siguientes, el extracto metanólico de hoja de *Nymphaea nouchali*, no es hemolítico a 0.1 mg/mL (Lakshmi, Smitha, Ammu, Priya, & Bhaskara Rao, 2014), En este estudio se evalúa la toxicidad a concentraciones altas, hasta 1 mg/mL y con extractos completos y se pudo observar que no presentaron una toxicidad significativa (aproximadamente 2.5 %). Otros trabajos (Vinjamuri et al. 2015) evaluaron el extracto hexánico de hojas de *Bridellia ferruginea*, estudiando el efecto hemolítico a concentraciones hasta 20 ng/mL, reportando una actividad hemolítica del 4.8 %. Por lo tanto, a concentraciones de interés del estudio realizado y de interés parasiticida, aquellas concentraciones menores de 200 µg/mL, los extractos no son significativamente hemolíticos ($p \leq 0.05$). Para el caso de la citoprotección, la termólisis del AAPH genera un flujo, de radicales peroxílo a 37 °C (Niki, 1990). Esto es de interés debido a que los radicales alquilo reaccionan con el oxígeno molecular para producir radicales peroxílo, y en presencia de eritrocitos atacan las membranas plasmáticas y permean las células (Chisté et al. 2014), provocando hemólisis (Shiva Shankar Reddy, Subramanyam, Vani, & Asha Devi, 2007).

Este comportamiento se utiliza como modelo *ex - vivo*, para estudiar la disrupción de las membranas celulares inducida por ROS (Pieroni, De Rezende, Ximenes, & Dokkedal, 2011). La hemólisis por AAPH es un modelo de evaluación de la propiedad inhibitoria de radicales libres de antioxidantes (Pieroni et al., 2011). Esta técnica se ha utilizado para evaluar extractos vegetales; un ejemplo es *Flemingia macrophylla* que mostró 95 % de inhibición de la hemólisis (Chiang et al., 2013). Además, los polifenoles pueden ser los responsables de la resistencia de los eritrocitos al estrés oxidativo *in-vitro* e *in-vivo*. Los extractos de *K. daigremontiana* no presentaron protección contra el daño oxidativo.

5.4 Estudios de acoplamiento

Los datos obtenidos del análisis mediante acoplamiento computacional, “Docking molecular” y simulaciones de dinámica molecular revelaron que la unión de berberina altera la conformación del heterodímero de tubulina, que podría ser el mecanismo molecular responsable de los efectos de despolarización en el ensamblaje de tubulina, en la inhibición de la polimerización de los microtúbulos y en la rápida interrupción de los microtúbulos preformados. Este mecanismo podría explicar nuestros resultados. De esta manera, la berberina forma un complejo estable con tubulina y se une a 24 Å del sitio de colchicina en la β -tubulina. Sobre la base de estas observaciones, es tentador sugerir que la berberina al unirse a la tubulina induce un cambio conformacional, de tal manera que los dímeros de tubulina unidos a la berberina no pueden polimerizar en microtúbulos incluso en presencia de inductores (Camel Paucar, Galeano, & Carrer, 2017).

La berberina podría incorporarse a los microtúbulos preformados en los extremos de los polímeros en crecimiento e inducir cambios conformacionales que son desfavorables para la adición de dímeros. Tales cambios conformacionales pueden causar inestabilidad termodinámica en la red de microtúbulos, resultando en su rápida interrupción. Para identificar el sitio de unión de Ber a tubulina, los aminoácidos involucrados en las interacciones entre Ber y tubulina y los tipos de fuerzas interactivas involucradas, se empleó un Docking molecular. Los resultados muestran que Ber, así como colchicina, interactúa estrechamente con los aminoácidos Thr 179A, Asn 255B, Val 318B e Ile 378B (Mohan, Raghav, Ashraf, Sebastian, & Rathinasamy, 2018). Después de una validación exitosa, Ber se acopló con β -tubulina. Para determinar la estabilidad del complejo berberina-tubulina, se tomó la mejor postura acoplada de berberina en el

heterodímero de tubulina. La berberina se ha utilizado tradicionalmente por sus diversas acciones farmacológicas, ya que exhibe actividades anticancerígenas notables y actualmente se encuentra en ensayos clínicos. En este estudio, informamos que la actividad antiparasitaria de la berberina podría deberse en parte a sus acciones inhibitorias sobre el ensamblaje de tubulina y microtúbulos (Raghav et al., 2017), ya que reportan que la Ber inhibió la proliferación de las células HeLa con una CI_{50} de 18 μM e indujo una despolimerización significativa de los microtúbulos interfásicos y mitóticos. Además, ejerció una detención moderada de G2 / M del ciclo celular además de un bloqueo mitótico. En otros ensayos, Ber inhibió la migración de las células HeLa lo que indica su excelente potencial como agente anticancerígeno. Estudios *in-vitro* con tubulina aislada del cerebro de cabra indicaron que la berberina se une a la tubulina en un solo sitio con un K_d de 11 μM . Además, este alcaloide inhibió el ensamblaje de la tubulina en los microtúbulos y también alteró los microtúbulos preformados polimerizados en presencia de glutamato y paclitaxel (Raghav et al., 2017). Otros estudios mencionan que este alcaloide tiene la capacidad de intercalarse en el sitio activo de la colchicina uniéndose a la subunidad beta de la tubulina donde Ber podría desplazar parcialmente a la colchicina de su sitio de unión (Zeng et al., 2019).

5.5 Formulaciones

La técnica de nanoprecipitación es una técnica de desplazamiento de solventes, en la cual se forman nanoesferas. Este método se lleva a cabo mediante dos solventes miscibles; el polímero como el analito o extracto, deben ser solubles en el solvente orgánico "FO" y que no sean solubles en el segundo, solvente "FA" (Bilati, Allémann, & Doelker, 2005). La nanoprecipitación es una técnica fácilmente reproducible es un proceso de un solo paso (D'Addio & Prud'homme, 2011). Existen variables para formar NP que dependen de la velocidad de inyección de la FO en la FA o de la velocidad de la mezcla. Esto afecta el tamaño de partícula como el rendimiento de encapsulación del fármaco o metabolito; el solvente orgánico también afecta el tamaño o la eficiencia de encapsulación y afecta también el PDI (Lee et al., 2016). La ventaja de utilizar este método es que es fácil y rápido y la formación de NP es instantánea. La selección de polímeros o mezclas poliméricas permiten a la formulación controlar numerosas propiedades, logrando un éxito en el campo de los productos farmacéuticos, incluyendo aplicaciones antimicrobianas, tratamiento del cáncer e ingeniería de tejidos (Ye & Chi, 2018). La producción de NP exitosa es restringida a la región de Ouzo. Más allá de esta

región se producen micropartículas en lugar de nanopartículas (Beck-broichsitter, Rytting, Lebhardt, Wang, & Kissel, 2010). Para preparar los formulados de NP, primero se realizó la estandarización para obtener parámetros idóneos para la obtención de T y PDI. Si los tamaños idóneos son menores o igual a 200 nm, se obtiene una mayor superficie de área de contacto de las NP con el órgano diana o sobre el parásito (Banerjee, Qi, Gogoi, Wong, & Mitragotri, 2016). Los Índices de polidispersidad (PDI) idóneos son los cercanos a 0.0, esto indica una formulación homogénea, ya que estas NP serían del mismo tamaño; valores de PDI arriba de 0,2 indican una variabilidad en los tamaños de las NP en las formulaciones (Lancheros, Beleño, Guerrero, & Godoy-Silva, 2014). En nuestro caso las NP mostraron ser homogéneas, con PDI menor de 0,2 en muchos de los casos.

Una vez obtenidos los parámetros para la elaboración de las NP mediante nanoprecipitación, se continuó para preparar las NP cargadas con el alcaloide, logrando incorporarlo eficientemente con el polímero EPO, el cual es un polímero farmacéuticamente aprobado para la administración oral. Es un polímero sintético no biodegradable, el cual brinda mayor estabilidad y reproducibilidad en las nano-formulaciones, comparado con polímeros naturales (Khoee & Yaghoobian, 2009). Se han realizado diversas investigaciones, para la formulación de NP con distintos activos integrados y para diversas aplicaciones, entre ellos se encuentra la incorporación de diclofenaco sódico con el polímero L-100 obteniendo tamaños de 270 nm y PDI menor de 0,15 (Cetin, Atila, & Kadioglu, 2010). También con el polímero EPO se logró incorporar meloxicam con tamaño de partícula de 94 nm y PDI de 0,1 (Khachane, Date, & Nagarsenker, 2011). O también se logró incorporar curcumina en PLGA, con tamaños de 80 a 90 nm y como resultado se aumentó su biodisponibilidad (Anand et al., 2010).

Finalmente se evaluó la propiedad citotóxica de las formulaciones, ya que un producto o fármaco debe ser no tóxico. Diferentes investigadores utilizan los eritrocitos como modelo para determinar la interacción de los medicamentos (Mombeshora & Mukanganyama, 2019). La hemólisis es el resultado de la destrucción del eritrocito vía lisis de la bicapa lipídica, la lisis puede causar anemia y aumento de la hemoglobina plasmática (Zarei et al., 2015). Los diferentes polímeros evaluados mostraron una actividad hemolítica menor al 1 %. La actividad hemolítica de 10-49 % se califica como ligeramente tóxica (Lakshmi et al., 2014). Por tanto, la actividad hemolítica menor a 1 %, obtenida en esta investigación, es un indicador de no toxicidad que favorece el estudio con estos polímeros.

En el desarrollo de una formulación una parte importante es la cuantificación del activo (Koyani & Vazquez-Duhalt, 2016), para determinar el porcentaje de eficiencia de encapsulación (% EE), en el presente estudio el porcentaje de encapsulación de berberina se determinó mediante una curva de calibración de Ber, comparando formulados de los 4 polímeros, comparando los formulados con y sin activo. Los rangos de encapsulación se encuentran en un rango de 17 a 72 %. El mayor %EE se obtuvo con el polímero EPO con 72,3 %, seguido de L100 con 47 %, E100 con 38,4 y finalmente L100-55 con una eficiencia del 17 %, además para constatar la forma de las NPs, los cuatro formulados mencionados fueron llevados a observación mediante el microscopio electrónico de barrido y efectivamente los formulados cargados con Ber, presentaron forma esférica y homogénea, esto indica que la técnica de nanoprecipitación, nos permite realizar formulados utilizando los polímeros de liberación controlada Eudragit, con tamaño nanométrico y con forma esférica y con PDI idóneo (Beck-Broichsitter, Rytting, Lebhardt, Wang, & Kissel, 2010).

Respecto a las ventajas que presenta el uso de los sistemas nano-particulados se han investigado innumerables estrategias para desarrollar nano-formulaciones a partir de polímeros biocompatibles y biodegradables. La aplicación de estos polímeros como vehículos de liberación de fármacos ha sido evaluado con resultados prometedores (Kumari et al., 2010). Calvo et al., (2010) reportaron eficiencias del 42, 52, 38 y 33 % con diferentes aceites de oliva libres y microencapsulados por el método de secado por aspersión (Calvo, Hernández, Lozano, & González-Gómez, 2010; Kumari, Yadav, & Yadav, 2010). Dillen et al., en 2006 evaluaron NP a partir de Eudragit®RS100 y RL100/PLGA para incorporar ciprofloxacina utilizando la técnica de doble emulsión agua-aceite-agua, determinando la actividad antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Dillen, Vandervoort, Van den Mooter, & Ludwig, 2006). Gupta et al., (2010) desarrollaron NP por la técnica de nanoprecipitación para encapsular esparfloxacina, con la finalidad de mejorar el tiempo de penetración ocular (Gupta et al., 2010). Cheow et al., en 2010 examinaron las características físicas de NP a base de EGLP y PCL preparadas por vía emulsificación - evaporación del solvente, en las cuales se evaluó la incorporación de ciprofloxacina y levofloxacina, demostrando que la alta eficiencia de encapsulación presentó una eficacia antibacteriana a dosis bajas (Cheow, Chang, & Hadinoto, 2010).

Ber es un alcaloide altamente hidrofóbico, lo cual dificulta su incorporación en una formulación. Se ha intentado incorporarlo en distintos sistemas de liberación, como lo son liposomas, ciclodextrinas o nano-suspensiones, pero dichas formulaciones presentan desventajas como la baja incorporación del fármaco (micelas), formación de agregados durante proceso de elaboración, baja absorción del fármaco encapsulado (Fahelbom, Timoney, & Corrigan, 1993), poca estabilidad de la formulación y pobre liberación del fármaco a partir del sistema (Souto et al., 2019). En contraste, se logró una eficiencia del proceso del hasta el 70 % para berberina. La formulación desarrollada en esta investigación ofrece una forma de incorporación y administración de berberina de manera inocua, ya que los polímeros no resultaron citotóxicos y presentaron estabilidad coloidal, lo cual se puede reflejar en una mayor estabilidad y en una innovadora forma de aplicación de las NP para el tratamiento de enfermedades parasitarias.

6 CONCLUSIONES

Primera.- Los resultados de este estudio revelaron un efecto *in-vitro* sobre *E. histolytica*, *T. vaginalis*, *S. venezuelensis* y *S. mansoni*, en condiciones axénicas, de los extractos crudos de las hojas de *A. mexicana*. La separación bioguiada con solventes de distinta polaridad demostró que la fracción AmH4 posee la actividad antiparasitaria más potente y resultó relativamente no tóxico para los eritrocitos humanos. Los principales compuestos de esta fracción resultaron en carbohidratos, terpenos, fenoles, flavonoides y principalmente alcaloides.

Segunda.- Los extractos y fracciones de *K. daigremontiana* no fueron eficaces en larvas (L3) de *S. venezuelensis* ni en *S. mansoni* (adultos). Hasta donde sabemos, el presente trabajo es el primero que evalúa las actividades antiparasitarias y la caracterización fitoquímica de *K. daigremontiana*.

Tercera.- Mediante distintos métodos cromatográficos y de espectrometría de masas, se pudo determinar la presencia mayoritaria del alcaloide berberina en la fracción AmH4, el cual fue el responsable de la actividad contra de los parásitos evaluados. También fue posible determinar la presencia de jatrorrhizina en forma minoritaria.

Cuarta.- El alcaloide berberina, no presentó citoprotección significativa sobre eritrocitos humanos. Además, dicho metabolito, demostró hemólisis significativa a partir de 0.6 mg/mL.

Quinta.- Mediante la técnica de acoplamiento molecular (Molecular Docking) y mediante el uso de bases de datos, se pudo determinar el posible sitio de acción del alcaloide berberina sobre la subunidad beta de la tubulina.

Sexta.- La técnica de nanoprecipitación permitió la obtención de partículas, menores a 200 nm, con tamaño homogéneos y con una eficiencia de encapsulación de hasta el 72 % para la berberina. Además, las formulaciones de NP a base de los polímeros Eudragit® no presentaron un efecto citotóxico sobre eritrocitos humanos.

7 PERSPECTIVAS

Este estudio pionero mostró resultados relevantes sobre la actividad de *A. mexicana* y sus fracciones frente a 4 distintos tipos de parásitos. Dicha planta ha sido utilizada tradicionalmente por la población indígena mexicana para enfermedades infecciosas (Ávila-Blanco et al. 2014). Como perspectivas a futuro, se recomienda continuar con el estudio de la actividad antiparasitaria de los extractos de *A. mexicana* y *K. daigremontiana*, estudio en contra de otros microorganismos como levaduras, hongos y bacterias de importancia clínica. También se sugiere realizar análisis químicos como la separación, fraccionamiento, aislamiento, purificación e identificación de los compuestos bioactivos, principalmente de las fracciones más prometedoras principalmente en los formulados con nanopartículas poliméricas. Además, se puede plantear la aplicación de los extractos como adyuvante en la terapia en contra de parásitos de importancia clínica humana obteniendo con ello productos fitoorgánicos menos dañinos para el humano. También se sugiere realizar ensayos en modelos *in-vivo* para evaluar dichas formulaciones con los extractos, fracciones o en este caso el alcaloide berberina.

8 REFERENCIAS

- Adebayo, J. O., & Krettli, A. U. (2011). Potential antimalarials from Nigerian plants: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 289–302. doi:10.1016/j.jep.2010.11.024
- Alderete, J. ., Benchimol, M., Lehker, M. ., & Crouch, M.-L. (2002). The complex fibronectin–Trichomonas vaginalis interactions and Trichomonosis. *Parasitology International*, 51(3), 285–292. doi:10.1016/S1383-5769(02)00015-6
- Alejandro, R., Hernández, P., Rivas, C. L., & Cárdenas, A. O. (2015). litiasis renal , capacidad de captura de radicales libres , metanólico de Berberis trifoliata, 46(1).
- Alkaloid, P. (1990). Anaerobic Protozoa in Axenic Culture ffo kai 1, 417–423.
- Alonso, M. J., Lorenzo-Lamosa, M. L., Remuñán-López, C., & Vila-Jato, J. L. (1998). Design of microencapsulated chitosan microspheres for colonic drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 52, 109–118.
- Anand, P., Nair, H. B., Sung, B., Kunnumakkara, A. B., Yadav, V. R., Tekmal, R. R., & Aggarwal, B. B. (2010). RETRACTED: Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. *Biochemical Pharmacology*, 79(3), 330–338. doi:10.1016/J.BCP.2009.09.003
- Angelucci, F., Basso, A., Bellelli, A., Brunori, M., Pica Mattoccia, L., & Valle, C. (2007). The anti-schistosomal drug praziquantel is an adenosine antagonist. *Parasitology*, 134(9), 1215–1221. doi:10.1017/S0031182007002600
- Appalasamy, S., Lo, K. Y., Ch’Ng, S. J., Nornadia, K., Othman, A. S., & Chan, L. K. (2014). Antimicrobial activity of artemisinin and precursor derived from in vitro plantlets of Artemisia annua L. *BioMed Research International*, 2014. doi:10.1155/2014/215872
- Applications, C., Diarrhea, B., & Parasites, I. (2000). Berberine, 5(2), 175–177.
- Ávila-Blanco, M. E., Rodríguez, M. G., Moreno Duque, J. L., Muñoz-Ortega, M., & Ventura-Juárez, J. (2014). Amoebicidal Activity of Essential Oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants in an Amoebic Liver Abscess Hamster Model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1–7. doi:10.1155/2014/930208
- Banerjee, A., Qi, J., Gogoi, R., Wong, J., & Mitragotri, S. (2016). Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 238, 176—185. doi:10.1016/j.jconrel.2016.07.051
- Beck-broichsitter, M., Rytting, E., Lebhardt, T., Wang, X., & Kissel, T. (2010). European Journal of Pharmaceutical Sciences Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery : A shift in the “ ouzo region ” upon drug loading. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(2), 244–253. doi:10.1016/j.ejps.2010.06.007
- Beck-Broichsitter, M., Rytting, E., Lebhardt, T., Wang, X., & Kissel, T. (2010). Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: A shift in the ‘ ouzo region ’ upon drug loading. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(2), 244–253. doi:10.1016/j.ejps.2010.06.007
- Bharti, N., Singh, S., Naqvi, F., & Azam, A. (2006). Isolation and in vitro antiamoebic activity of iridoids isolated from Kigelia pinnata. *Arkivoc*, 2006(10), 69–76. doi:10.3998/ark.5550190.0007.a09
- Bilati, U., Allémann, E., & Doelker, E. (2005). Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24(1), 67–75. doi:10.1016/J.EJPS.2004.09.011
- Birdsall, T., & GS, K. (1997). Therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants. *Altern Med Rev*, 2(2), 94–103.
- Bourguinat, C., Kamgno, J., Boussinesq, M., Mackenzie, C. D., Prichard, R. K., & Geary, T. G. (2010). Analysis of the mdr-1 gene in patients co-infected with Onchocerca volvulus and Loa loa who experienced a post-ivermectin serious adverse event. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(1), 28–32. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0734
- Brahmachari, G., Gorai, D., & Roy, R. (2013a). Argemone mexicana : chemical and pharmacological aspects #. *Revista Brasileira de Farmacognosia - Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23(3), 559–575. doi:10.1590/S0102-695X2013005000021
- Brahmachari, G., Gorai, D., & Roy, R. (2013b). Argemone mexicana: Chemical and pharmacological aspects.

- Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23(3), 559–575. doi:10.1590/S0102-695X2013005000021
- Buckner, F. S., Waters, N. C., & Avery, V. M. (2012). Recent highlights in anti-protozoan drug development and resistance research. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 230–235. doi:10.1016/j.ijpddr.2012.05.002
- Calvo, P., Hernández, T., Lozano, M., & González-Gómez, D. (2010). Microencapsulation of extra-virgin olive oil by spray-drying: Influence of wall material and olive quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(8), 852–858. doi:10.1002/ejlt.201000059
- Calzada, F., Yépez-Mulia, L., & Tapia-Contreras, A. (2007). Effect of Mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(2), 248–251. doi:10.1016/j.jep.2007.06.001
- Camel Paucar, V., Galeano, E., & Carrer, H. (2017). Análisis in silico y expresión génica del factor de transcripción TgNAC01 implicado en xilogénesis y estrés abiótico en *tectona grandis*. *Acta Biologica Colombiana*, 22(3), 359–369. doi:10.15446/abc.v22n3.62164
- Cetin, M., Atila, A., & Kadioglu, Y. (2010). Formulation and In vitro Characterization of Eudragit® L100 and Eudragit® L100-PLGA Nanoparticles Containing Diclofenac Sodium. *AAPS PharmSciTech*, 11(3), 1250–1256. doi:10.1208/s12249-010-9489-6
- Chang, Y. C., Chang, F. R., Khalil, A. T., Hsieh, P. W., & Wu, Y. C. (2003). Cytotoxic benzophenanthridine and benzyloquinoline alkaloids from *Argemone mexicana*. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 58(7–8), 521–526.
- Chaudhary, K. K., & Mishra, N. (2016). A Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery. *JSM Chem*, 4(3), 1029. Retrieved from www.pdb.org.
- Chavassee, C. J., Brown, M. C., & Bell, D. R. (1979). *Schistosoma mansoni*: Activity responses in vitro to praziquantel. *Zeitschrift Für Parasitenkunde Parasitology Research*, 58(2), 169–174. doi:10.1007/BF01951341
- Cheow, W. S., Chang, M. W., & Hadinoto, K. (2010). Antibacterial efficacy of inhalable levofloxacin-loaded polymeric nanoparticles against *E. coli* biofilm cells: The effect of antibiotic release profile. *Pharmaceutical Research*, 27(8), 1597–1609. doi:10.1007/s11095-010-0142-6
- Chiang, H. M., Chiu, H. H., Liao, S. T., Chen, Y. T., Chang, H. C., & Wen, K. C. (2013). Isoflavonoid-rich *Flemingia macrophylla* extract attenuates UVB-induced skin damage by scavenging reactive oxygen species and inhibiting MAP kinase and MMP expression. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. doi:10.1155/2013/696879
- Chisté, R. C., Freitas, M., Mercadante, A. Z., & Fernandes, E. (2014). Carotenoids inhibit lipid peroxidation and hemoglobin oxidation, but not the depletion of glutathione induced by ROS in human erythrocytes. *Life Sciences*, 99(1–2), 52–60. doi:10.1016/J.LFS.2014.01.059
- Chitsulo, L., Loverde, P., & Engels, D. (2004). Schistosomiasis. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 12–13. doi:10.1038/nrmicro801
- Colley, D. G., Bustinduy, A. L., Secor, W. E., & King, C. H. (2014). Human schistosomiasis. *Lancet (London, England)*, 383(9936), 2253–2264. doi:10.1016/S0140-6736(13)61949-2
- Corti, M. (2016). *Strongyloides stercoralis* in immunosuppressed patients. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, 11(1), 1–10. doi:10.5812/archcid.27510
- Costa, S. S., Muzitano, M. F., Camargo, L. M. M., & Coutinho, M. A. S. (2008). Therapeutic potential of *Kalanchoe* species: Flavonoids and other secondary metabolites. *Natural Product Communications*, 3(12), 2151–2164. doi:10.1177/1934578x0800301236
- Cudmore, S. L., Delgaty, K. L., Hayward-McClelland, S. F., Petrin, D. P., & Garber, G. E. (2004). Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 783–793, table of contents. doi:10.1128/CMR.17.4.783-793.2004
- D'Addio, S. M., & Prud'homme, R. K. (2011). Controlling drug nanoparticle formation by rapid precipitation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(6), 417–426. doi:10.1016/j.addr.2011.04.005
- Da Silva, S. A. G., Costa, S. S., Mendonça, S. C. F., Silva, E. M., Moraes, V. L. G., & Rossi-Bergmann, B. (1995). Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. *Acta Tropica*, 60(3), 201–210. doi:10.1016/0001-706X(95)00128-2
- Davoodi, J., & Abbasi-Maleki, S. (2018). Effect of *Origanum vulgare* hydroalcoholic extract on *Giardia lamblia* cysts compared with metronidazole in vitro. *Iranian Journal of Parasitology*, 13(3), 486–492.
- Del Pilar García-Corvillo, M. (2016). Nanopartículas poliméricas de administración intranasal para la liberación de activos en el sistema nervioso central Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to the Central Nervous System Via Nasal Route. *Ars Pharm*, 57(1), 27–35.
- Di, S. (2014). *Tricomona* Un Asecto Amplio, 27(2), 198–205.

- DiGiulio, M. (2019). Strongyloidiasis. *Journal for Nurse Practitioners*, 15(6), 438–443. doi:10.1016/j.nurpra.2019.03.015
- Dillen, K., Vandervoort, J., Van den Mooter, G., & Ludwig, A. (2006). Evaluation of ciprofloxacin-loaded Eudragit® RS100 or RL100/PLGA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 314(1), 72–82. doi:10.1016/j.IJPHARM.2006.01.041
- Dingsdag, S. A., & Hunter, N. (2018). Metronidazole: an update on metabolism, structure-cytotoxicity and resistance mechanisms. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(2), 265–279. doi:10.1093/jac/dkx351
- Duncan, J. (2015). Participation in global governance: Coordinating ‘the voices of those most affected by food insecurity’. *Global Food Security Governance*, 1263(January 2015), 1–11. doi:10.1007/978-1-4939-2269-7
- Dvorák, J., Mashiyama, S. T., Braschi, S., Sajid, M., Knudsen, G. M., Hansell, E., ... McKerrow, J. H. (2008). Differential use of protease families for invasion by schistosome cercariae. *Biochimie*, 90(2), 345–358. doi:10.1016/j.biochi.2007.08.013
- El Abdellaoui, S., Destandau, E., Toribio, A., Elfakir, C., Lafosse, M., Renimel, I., ... Landemarre, L. (2010). Bioactive molecules in Kalanchoe pinnata leaves: Extraction, purification, and identification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(3), 1329–1338. doi:10.1007/s00216-010-4047-3
- Fahelalbom, K. M. S., Timoney, R. F., & Corrigan, O. I. (1993). Micellar Solubilization of Clofazimine Analogues in Aqueous Solutions of Ionic and Nonionic Surfactants. *Pharmaceutical Research*, 10(4), 631–634. doi:10.1023/A:1018978809545
- Falk, R., Randolph, T. W., Meyer, J. D., Kelly, R. M., & Manning, M. C. (1997). Controlled release of ionic compounds from poly (l-lactide) microspheres produced by precipitation with a compressed antisolvent. *Journal of Controlled Release*, 44(1), 77–85. doi:10.1016/S0168-3659(96)01508-8
- FAO/WHO, F. and A. O. of the U. N. H. O. (2014). *Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. Microbiological Risk Assessment Series*. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i3649e.pdf%5Cnfiles/540/a-i3649e.pdf>
- Fernandes, J. M., Cunha, L. M., Azevedo, E. P., Lourenço, E. M. G., Fernandes-Pedrosa, M. F., & Zucolotto, S. M. (2019). Kalanchoe laciniata and Bryophyllum pinnatum: an updated review about ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(4), 529–558. doi:10.1016/j.bjp.2019.01.012
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N., & Benita, S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55(1), 1–4. doi:10.1016/0378-5173(89)90281-0
- Froio, F., Ginot, L., Paolino, D., Lebaz, N., Bentaher, A., Fessi, H., & Elaissari, A. (2019). Essential oils-loaded polymer particles: Preparation, characterization and antimicrobial property. *Polymers*, 11(6). doi:10.3390/polym11061017
- Fürer, K., Simões-Wüst, A. P., Von Mandach, U., Hamburger, M., & Potterat, O. (2016). Bryophyllum pinnatum and Related Species Used in Anthroposophic Medicine: Constituents, Pharmacological Activities, and Clinical Efficacy. *Planta Medica*, 82(11–12), 930–941. doi:10.1055/s-0042-106727
- Gotuzzo, E., Echevarria, J., Ac, W. J., Terashima, A., Samalvides, F., Ja, P., & Mn, P. (2016). Ivermectin versus albendazole or thiabendazole for Strongyloides stercoralis infection (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (1). doi:10.1002/14651858.CD007745.pub3.www.cochranelibrary.com
- Grycová, L., Dostál, J., & Marek, R. (2007). Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry*, 68(2), 150–175. doi:10.1016/j.phytochem.2006.10.004
- Guerrant, R. L. (2011). THE GLOBAL PROBLEM OF AMEBIASIS : CURRENT STATUS , FOR PROGRESS RESEARCH NEEDS , AND OPPORTUNITIES Amebiasis : Introduction , Current Status , and Research Questions, 8(2), 218–227.
- Gupta, H., Aqil, M., Khar, R. K., Ali, A., Bhatnagar, A., & Mittal, G. (2010). Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(2), 324–333. doi:10.1016/j.nano.2009.10.004
- Hamid, H. K. S. (2019). Schistosoma japonicum-Associated Colorectal Cancer: A Review. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(3), 501–505. doi:10.4269/ajtmh.18-0807
- Hamman, J. H. (2010). Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Marine Drugs*, 8(4), 1305–1322. doi:10.3390/md8041305
- Han, C. S., Kim, S., Oh, D. W., Yoon, J. Y., Park, E. S., Rhee, Y. S., ... Park, C. W. (2019). Preparation, characterization, and stability evaluation of taste-masking Lacosamide microparticles. *Materials*, 12(6). doi:10.3390/ma12061000
- Ji, Y., Lemberg, M., Prudic, A., Paus, R., & Sadowski, G. (2017). Modeling and analysis of dissolution of paracetamol/Eudragit® formulations. *Chemical Engineering Research and Design*, 121, 22–31.

- doi:10.1016/j.cherd.2017.03.007
- John, H. (2003). Albendazole for the treatment of echinococcosis. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 17(2), 205–212. doi:10.1046/j.1472-8206.2003.00171.x
- Johnston, V. J., & Mabey, D. C. (2008). Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21(1), 56–64. doi:10.1097/QCO.0b013e3282f3d999
- Kagan, I. A., & Flythe, M. D. (2014). Thin-Layer Chromatographic (TLC) separations and bioassays of plant extracts to identify antimicrobial compounds. *Journal of Visualized Experiments*, (85), 1–8. doi:10.3791/51411
- Karimi, G., Aghasizadeh, M., Razavi, M., & Taghiabadi, E. (2011). Protective effects of aqueous and ethanolic extracts of *Nigella sativa* L. and *Portulaca oleracea* L. on free radical induced hemolysis of RBCs. *Daru : Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 19(4), 295–300.
- Khachane, P., Date, A. A., & Nagarsenker, M. S. (2011). Eudragit EPO nanoparticles: application in improving therapeutic efficacy and reducing ulcerogenicity of meloxicam on oral administration. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 7(4), 590–597. doi:10.1166/jbn.2011.1322
- Khayata, N., Abdelwahed, W., Chehna, M. F., Charcosset, C., & Fessi, H. (2012). Preparation of vitamin e loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor. *International Journal of Pharmaceutics*, 423(2), 419–427. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.12.016
- Khoei, S., & Yaghoobian, M. (2009). An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(6), 2392–2399. doi:10.1016/j.ejmech.2008.09.045
- King, S. E., & Mascie-Taylor, C. G. N. (2004). Strongyloides fuelleborni kellyi and other intestinal helminths in children from Papua New Guinea: associations with nutritional status and socioeconomic factors. *Papua and New Guinea Medical Journal*, 47(3–4), 181–191.
- Koyani, R. D., & Vazquez-Duhalt, R. (2016). Laccase encapsulation in chitosan nanoparticles enhances the protein stability against microbial degradation. *Environmental Science and Pollution Research International*, 23(18), 18850–18857. doi:10.1007/s11356-016-7072-8
- Kucik, C. J., Martin, G. L., & Sortor, B. V. (2004). Common intestinal parasites. *American Family Physician*, 69(5), 1161–1168.
- Kumar, G., Loganathan, K., & Rao, B. (2011). Hemolytic activity of Indian medicinal plants towards human erythrocytes: An in vitro study. *Elixir Appl. Botany*, 40, 5534–5537.
- Kumar, M., & Awasthi, R. (2015). Development of Metronidazole-Loaded Colon-Targeted Microparticulate Drug Delivery System. *Polimery w Medycynie*, 45(2), 57–65. doi:10.17219/pim/60583
- Kumar, P., Bansal, V., Paul, A. K., Bharadwaj, L. M., Deep, A., & Kim, K. (2015). Biological applications of zinc imidazole framework through protein encapsulation Biological applications of zinc imidazole framework through protein encapsulation. *Applied Nanoscience*, (January 2016). doi:10.1007/s13204-015-0511-x
- Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001
- Kyu, H. H., Abate, D., Abate, K. H., Abay, S. M., Abbafati, C., Abbasi, N., ... Murray, C. J. L. (2018). Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 392(10159), 1859–1922. doi:10.1016/S0140-6736(18)32335-3
- Lackey, E. K., & Horrall, S. (2020). Schistosomiasis (*Schistosoma Haematobium*). Treasure Island (FL).
- Laing, R., Gillan, V., & Devaney, E. (2017). Ivermectin – Old Drug, New Tricks? *Trends in Parasitology*, 33(6), 463–472. doi:10.1016/j.pt.2017.02.004
- Lakshmi, G., Smitha, N., Ammu, S. V., Priya, C. L., & Bhaskara Rao, K. V. (2014). Phytochemical profile, in vitro antioxidant and hemolytic activities of various leaf extract of *Nymphaea Nouchali* Linn: An in vitro study. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(6), 548–552.
- Lancheros, R. J., Beleño, J. Á., Guerrero, C. A., & Godoy-Silva, R. D. (2014). PLGA nanoparticles production by emulsion and evaporation to encapsulate N-acetylcysteine (NAC). *Universitas Scientiarum*, 19(2), 161–168. doi:10.11144/Javeriana.SC19-2.pnpm
- Lauria-Pires, L., Santana, J. M., Tavares, F. S., & Teixeira, A. R. (1997). Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas disease patients: I--Behavioral characterization in vitro. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30(3), 187–192. doi:10.1590/S0037-86821997000300003
- Lee, B. K., Yun, Y., & Park, K. (2016). PLA micro- and nano-particles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 176–191. doi:10.1016/j.addr.2016.05.020
- Legarda-Ceballos, A. L., López-Abán, J., Del Olmo, E., Escarcena, R., Bustos, L. A., Rojas-Caraballo, J., ... Muro, A. (2016a). In vitro and in vivo evaluation of 2-aminoalkanol and 1,2-alkanediamine derivatives

- against *Strongyloides venezuelensis*. *Parasites and Vectors*, 9(1). doi:10.1186/s13071-016-1648-5
- Legarda-Ceballos, A. L., López-Abán, J., Del Olmo, E., Escarcena, R., Bustos, L. A., Rojas-Caraballo, J., ... Muro, A. (2016b). In vitro and in vivo evaluation of 2-aminoalkanol and 1,2-alkanediamine derivatives against *Strongyloides venezuelensis*. *Parasites and Vectors*, 9(1). doi:10.1186/s13071-016-1648-5
- Legarda-Ceballos, A. L., Rojas-Caraballo, J., López-Abán, J., Ruano, A. L., Yepes, E., Gajate, C., ... Muro, A. (2016). The alkylphospholipid edelfosine shows activity against *Strongyloides venezuelensis* and induces apoptosis-like cell death. *Acta Tropica*, 162, 180–187. doi:10.1016/j.actatropica.2016.07.001
- Li, Y., Wang, H., Si, N., Ren, W., Han, L., Xin, S., ... Bian, B. (2015). Metabolic profiling analysis of berberine, palmatine, jatrorrhizine, coptisine and epiberberine in zebrafish by ultra-high performance liquid chromatography coupled with LTQ Orbitrap mass spectrometer. *Xenobiotica*, 45(4), 302–311. doi:10.3109/00498254.2014.979270
- Liu, F., Li, Z., Shi, X., & Zhong, M. (2011). Determination of berberine, palmatine and jatrorrhizine in rabbit plasma by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56(5), 1006–1015. doi:10.1016/j.jpba.2011.08.001
- Lu, M., Xiong, D., Sun, W., Yu, T., Hu, Z., Ding, J., ... Pan, B. (2017). Sustained release ivermectin-loaded solid lipid dispersion for subcutaneous delivery: In vitro and in vivo evaluation. *Drug Delivery*, 24(1), 622–631. doi:10.1080/10717544.2017.1284945
- Magaisa, K., Taylor, M., Kjetland, E. F., & Naidoo, P. J. (2015). A review of the control of schistosomiasis in South Africa. *South African Journal of Science*, 111(11–12), 1–6. doi:10.17159/sajs.2015/20140427
- Malebo, H. M., Wenzler, T., Cal, M., Swaleh, S. M., Omolo, M. O., Hassanali, A., ... Ndiege, I. O. (2013). Anti-protozoal activity of aporphine and protoberberine alkaloids from *Annickia kummeriae* (Engl. & Diels) Setten & Maas (Annonaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13. doi:10.1186/1472-6882-13-48
- Martins, W. A., Melo, A. L., Nicoli, J. R., Cara, D. C., Carvalho, M. A. R., Lana, M. A., ... Farias, L. M. (2000). A method of decontaminating *Strongyloides venezuelensis* larvae for the study of strongyloidiasis in germ-free and conventional mice. *Journal of Medical Microbiology*, 49(4), 387–390. doi:10.1099/0022-1317-49-4-387
- Mata-Cárdenas, B. D., Vargas-Villarreal, J., González-Salazar, F., Palacios-Corona, R., & Said-Fernández, S. (2008). A new vial microassay to screen antiprotozoal drugs. *Pharmacologyonline*, 1, 529–537.
- McClellan, S., Prosser, E., Meehan, E., O'Malley, D., Clarke, N., Ramtoola, Z., & Brayden, D. (1998). Binding and uptake of biodegradable poly-DL-lactide micro- and nanoparticles in intestinal epithelia. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(2), 153–163. doi:10.1016/S0928-0987(97)10007-0
- Meléndez González, C. A. (2013). Risks of herbalism: a case report of Mexican poppy (*Argemone mexicana* L) induced liver toxicity. *Medwave*, 13(07), e5763–e5763. doi:10.5867/medwave.2013.07.5763
- Milad, R. (2014). Genus *Kalanchoe* (Crassulaceae): A Review of Its Ethnomedicinal, Botanical, Chemical and Pharmacological Properties. *European Journal of Medicinal Plants*, 4(1), 86–104. doi:10.9734/ejmp/2014/5901
- Mohan, L., Raghav, D., Ashraf, S. M., Sebastian, J., & Rathinasamy, K. (2018). Indirubin, a bis-indole alkaloid binds to tubulin and exhibits antimitotic activity against HeLa cells in synergism with vinblastine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105, 506–517. doi:10.1016/J.BIOPHA.2018.05.127
- Mombeshora, M., & Mukanganyama, S. (2019). Antibacterial activities, proposed mode of action and cytotoxicity of leaf extracts from *Triumfetta welwitschii* against *Pseudomonas aeruginosa*, 1–12.
- Moniuszko-Szajwaj, B., Pecio, Ł., Kowalczyk, M., & Stochmal, A. (2016). New bufadienolides isolated from the roots of *kalanchoe daigremontiana* (crassulaceae). *Molecules*, 21(3). doi:10.3390/molecules21030243
- Moustafine, R. I., Kabanova, T. V., Kemenova, V. A., & Van den Mooter, G. (2005). Characteristics of interpolyelectrolyte complexes of Eudragit E100 with Eudragit L100. *Journal of Controlled Release*, 103(1), 191–198. doi:https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.11.031
- Müller, R. H., Mäder, K., & Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 50(1), 161–177. doi:10.1016/S0939-6411(00)00087-4
- Mundodi, V., Kucknoor, A. S., Chang, T. H., & Alderete, J. F. (2006). A novel surface protein of *Trichomonas vaginalis* is regulated independently by low iron and contact with vaginal epithelial cells. *BMC Microbiology*, 6, 1–12. doi:10.1186/1471-2180-6-6
- Muñoz, V., Sauvain, M., Bourdy, G., Callapa, J., Rojas, I., Vargas, L., ... Deharo, E. (2000). The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosetene indians. *Journal of Ethnopharmacology*, 69(2), 139–155. doi:10.1016/S0378-8741(99)00096-3

- Muzitano, M. F., Cruz, E. A., De Almeida, A. P., Da Silva, S. A. G., Kaiser, C. R., Guette, C., ... Costa, S. S. (2006). Quercitrin: An antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. *Planta Medica*, 72(1), 81–83. doi:10.1055/s-2005-873183
- Muzitano, M. F., Tinoco, L. W., Guette, C., Kaiser, C. R., Rossi-Bergmann, B., & Costa, S. S. (2006). The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry*, 67(18), 2071–2077. doi:10.1016/j.phytochem.2006.06.027
- Nguyen, C. A., Konan-Kouakou, Y. N., Allémann, E., Doelker, E., Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., & Gurny, R. (2006). Preparation of surfactant-free nanoparticles of methacrylic acid copolymers used for film coating. *AAPS PharmSciTech*, 7(3). doi:10.1208/pt070363
- Nigenda, G., Mora-Flores, G., Aldama-López, S., & Orozco-Núñez, E. (2001). La práctica de la medicina tradicional en América Latina y el Caribe: El dilema entre regulación y tolerancia. *Salud Publica de Mexico*, 43(1), 41–51. doi:10.1590/S0036-36342001000100006
- Niki, E. (1990). [3] Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. *Methods in Enzymology*, 186, 100–108. doi:10.1016/0076-6879(90)86095-D
- Nonaka, M., Murata, Y., Takano, R., Han, Y., Bin Kabir, M. H., & Kato, K. (2018). Screening of a library of traditional Chinese medicines to identify anti-malarial compounds and extracts. *Malaria Journal*, 17(1), 1–10. doi:10.1186/s12936-018-2392-4
- Onguéné, P. A., Ntie-Kang, F., Lifongo, L. L., Ndom, J. C., Sippl, W., & Mbaze, L. M. (2014). The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants, part III: a pharmacological evaluation of non-alkaloids and non-terpenoids. *Malaria Journal*, 13(1), 81. doi:10.1186/1475-2875-13-81
- Orozco, E., López, C., Gómez, C., Pérez, D. G., Marchat, L., Bañuelos, C., & Delgadillo, D. M. (2002). Multidrug resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Parasitology International*, 51(4), 353–359. doi:10.1016/S1383-5769(02)00041-7
- Ortiz, A. M. (2016). *Argemone mexicana* (L.), 1753, 1–8.
- Pal, D., Banerjee, S., Cui, J., Schwartz, A., Ghosh, S. K., & Samuelson, J. (2009). Giardia, Entamoeba, and Trichomonas enzymes activate metronidazole (nitroreductases) and inactivate metronidazole (nitroimidazole reductases). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), 458–464. doi:10.1128/AAC.00909-08
- Panic, G., Duthaler, U., Speich, B., & Keiser, J. (2014). Repurposing drugs for the treatment and control of helminth infections. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(3), 185–200. doi:10.1016/j.ijpddr.2014.07.002
- Parasitol, I. J., & Article, R. (2013). Anthelmintics Resistance; How to Overcome it?, 8(1), 18–32.
- Patel, B., Patel, P., & Patel, R. (2011). Effect of different extracts from *Celosia argentea* on calcium and phosphate inhibition in vitro. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(4), 337–339.
- Patil, S. B., Dongare, V. R., Kulkarni, C. R., Joglekar, M. M., & Arvindekar, A. U. (2013). Antidiabetic activity of *Kalanchoe pinnata* in streptozotocin-induced diabetic rats by glucose independent insulin secretagogue action. *Pharmaceutical Biology*, 51(11), 1411–1418. doi:10.3109/13880209.2013.794364
- Patra, C. N., Priya, R., Swain, S., Kumar Jena, G., Panigrahi, K. C., & Ghose, D. (2017). Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 33–45. doi:10.1016/j.fjps.2017.02.001
- Pérez-arellano, J. L., & Bolaños-rivero, M. (2010). Artrópodos y enfermedades, 10(55).
- Pérez-arellano, J. L., & Carranza-rodríguez, C. (2010). Amebosis , giardosis y tricomonosis. *Medicine*, 10(54), 3609–3620.
- Pérez-Molina, J. A., Díaz-Menéndez, M., Pérez-Ayala, A., Ferrere, F., Monje, B., Norman, F., & López-Vélez, R. (2010). Tratamiento de las enfermedades causadas por parásitos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(1), 44–59. doi:10.1016/j.eimc.2009.11.003
- Pieroni, L. G., De Rezende, F. M., Ximenes, V. F., & Dokkedal, A. L. (2011). Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *miconia albicans* (Sw.) triana leaves. *Molecules*, 16(11), 9439–9450. doi:10.3390/molecules16119439
- Pires-Santos, G. M., Santana-Anjos, K. G., & Vannier-Santos, M. A. (2012). Optimization of *Entamoeba histolytica* culturing in vitro. *Experimental Parasitology*, 132(4), 561–565. doi:10.1016/j.exppara.2012.09.011
- Pires, A. S. (2009). Thesis Investigation of antiplasmodial compounds from various plant extracts extracts : *Argemone mexicana* L . (Papaveraceae), *Licania*. *Sciences-New York*.
- Polomo, A. (2010). Diagnóstico Parasitológico a partir de muestras fecales (II). *Cría y Salud*, 29(6), 22. Retrieved from [http://axonveterinaria.net/web_axoncomunicacion/criaysalud/29/cys_29_22-24_Diagnostico_parasitologico_partir_muestras_fecales_\(II\).pdf](http://axonveterinaria.net/web_axoncomunicacion/criaysalud/29/cys_29_22-24_Diagnostico_parasitologico_partir_muestras_fecales_(II).pdf)
- Puertas Mejía, M. A., Tobón Gallego, J., & Arango, V. (2014). *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet. & H.

- and its potential use as a source of natural antioxidants and colorants. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(1), 61–68.
- Raghav, D., Ashraf, S. M., Mohan, L., & Rathinasamy, K. (2017). Berberine Induces Toxicity in HeLa Cells through Perturbation of Microtubule Polymerization by Binding to Tubulin at a Unique Site. *Biochemistry*, 56(20), 2594–2611. doi:10.1021/acs.biochem.7b00101
- Rajvaidhya, S., & Pradesh, M. (2012). A review on Argemone mexicana linn. An Indian Medicinal Plant. *Ijpsr*, 3(08), 2494–2501.
- Ramos Picos, D., Gómez Carril, M., Fernández Mena, D., & Núñez de la Fuente, L. (1999). Microesferas biodegradables de liberación controlada para administración parenteral. *Rev. Cuba. Farm*, 34(1), 70–77.
- Rana, A. K., & Misra-Bhattacharya, S. (2013). Current drug targets for helminthic diseases. *Parasitology Research*, 112(5), 1819–1831. doi:10.1007/s00436-013-3383-6
- Reis, C. P., & Neufeld, R. J. (2006). Nanoencapsulation I . Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, 2, 8–21. doi:10.1016/j.nano.2005.12.003
- Rizvi, S. M., Shazi, S., & Mohd., H. (2013). a Simple Click By Click Protocol To Perform Docking : *EXCLI Journal*, 12, 831–857. doi:10.17877/DE290R-11534
- Robertson, L. J. (2018). *Parasites in Food: From a Neglected Position to an Emerging Issue. Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 86). Elsevier Inc. doi:10.1016/bs.afnr.2018.04.003
- Rodríguez-Luis, O. E., Hernández-Delgadillo, R., Pineda-Aguilar, N., Vargas-Villarreal, J., González-Salazar, F., Garza-González, J. N., ... Cabral-Romero, C. (2017). Effect of bismuth lipophilic nanoparticles (BisBAL NPs) on Trichomonas vaginalis growth. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 17(7), 4618–4622. doi:10.1166/jnn.2017.13743
- Roth, G. A., Abate, D., Abate, K. H., Abay, S. M., Abbafati, C., Abbasi, N., ... Murray, C. J. L. (2018). Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 392(10159), 1736–1788. doi:10.1016/S0140-6736(18)32203-7
- Ruano, A. L., Martín, T., Pardo, J., López-Abán, J., & Alvarez Muro, A. (2005). Avances en el estudio sobre la estrongiloidosis. *Enfermedades Emergentes*, 7(2), 102–109.
- Saikia, S., & Bordoloi, M. (2019). Molecular Docking: Challenges, Advances and its Use in Drug Discovery Perspective. *Current Drug Targets*, 20(5), 501–521. doi:10.2174/1389450119666181022153016
- Sarang, B., Jana, U., Sahoo, J., Mohanta, G. P., & Manna, P. K. (2018). Systematic approach for the formulation and optimization of atorvastatin loaded solid lipid NANOAPARTICLES using response surface methodology. *Biomedical Microdevices*, 20(3), 53. doi:10.1007/s10544-018-0285-5
- Sester, C., Ofridam, F., Lebaz, N., Gagnière, E., Mangin, D., & Elaissari, A. (2020). pH-Sensitive methacrylic acid–methyl methacrylate copolymer Eudragit L100 and dimethylaminoethyl methacrylate, butyl methacrylate, and methyl methacrylate tri-copolymer Eudragit E100. *Polymers for Advanced Technologies*, 31(3), 440–450. doi:10.1002/pat.4780
- Sharanappa, R., & Vidyasagar, G. M. (2014). Plant profile, Phytochemistry and Pharmacology of Argemone Mexicana Linn. A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(7), 45–53.
- Sharma, B. D., Malhotra, S., Bhatia, V., & Rathee, M. (1999). Epidemic dropsy in India, 657–661.
- Shiva Shankar Reddy, C. S., Subramanyam, M. V. V., Vani, R., & Asha Devi, S. (2007, December). In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes: Effect of antioxidant supplements. *Toxicology in Vitro*. doi:10.1016/j.tiv.2007.06.010
- Siddiqui, A. A., & Berk, S. L. (2001). Diagnosis of Strongyloides stercoralis Infection . *Clinical Infectious Diseases*, 33(7), 1040–1047. doi:10.1086/322707
- Siles-Lucas, M., Casulli, A., Cirilli, R., & Carmena, D. (2018). *Progress in the pharmacological treatment of human cystic and alveolar echinococcosis: Compounds and therapeutic targets. PLoS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 12). doi:10.1371/journal.pntd.0006422
- Singh, B., Srivastava, J. S., Khosa, R. L., & Singh, U. P. (2001). Individual and combined effects of berberine and santonin on spore germination of some fungi. *Folia Microbiologica*, 46(2), 137–142. doi:10.1007/BF02873592
- Singh, S., & Taylor, P. (2010). A new benzyloquinoline alkaloid from Argemone mexicana, (January). doi:10.1080/14786410902800723
- Singh, S., Verma, M., Malhotra, M., Prakash, S., & Singh, T. D. (2016). Cytotoxicity of alkaloids isolated from Argemone mexicana on SW480 human colon cancer cell line, 54(4), 740–745. doi:10.3109/13880209.2015.1073334
- Souto, E. B., Souto, S. B., Campos, J. R., Severino, P., Pashirova, T. N., Zakharova, L. Y., ... Durazzo, A. (2019). Nanoparticle Delivery Systems in the Treatment of Diabetes Complications, 1–28.

- doi:10.3390/molecules24234209
- Sun, Y., Chen, D., Pan, Y., Qu, W., Hao, H., Wang, X., ... Xie, S. (2019). Nanoparticles for antiparasitic drug delivery. *Drug Delivery*, 26(1), 1206–1221. doi:10.1080/10717544.2019.1692968
- Tang, D. Q., Zheng, X. X., Chen, X., Yang, D. Z., & Du, Q. (2014). Quantitative and qualitative analysis of common peaks in chemical fingerprint of Yuanhu Zhitong tablet by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 4(2), 96–106. doi:10.1016/j.jpha.2013.12.004
- Tanowitz, H. B., Weiss, L. M., & Wittner, M. (2001). Tapeworms. *Current Infectious Disease Reports*, 3(1), 77–84. doi:10.1007/s11908-001-0062-z
- Tillhon, M., Guamán Ortiz, L. M., Lombardi, P., & Scovassi, A. I. (2012). Berberine: New perspectives for old remedies. *Biochemical Pharmacology*, 84(10), 1260–1267. doi:10.1016/j.bcp.2012.07.018
- Tritten, L., Silbereisen, A., & Keiser, J. (2011). In vitro and in vivo efficacy of monepantel (AAD 1566) against laboratory models of human intestinal nematode infections. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(12), 1–7. doi:10.1371/journal.pntd.0001457
- Ürményi, F. G. G., Saraiva, G. do N., Casanova, L. M., Matos, A. dos S., de Magalhães Camargo, L. M., Romanos, M. T. V., & Costa, S. S. (2016). Anti-HSV-1 and HSV-2 Flavonoids and a New Kaempferol Triglycoside from the Medicinal Plant *Kalanchoe daigremontiana*. *Chemistry and Biodiversity*, 13(12), 1707–1714. doi:10.1002/cbdv.201600127
- Vadlamudi, R. S., Chi, D. S., & Krishnaswamy, G. (2006). Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. *Clinical and Molecular Allergy*, 4, 1–13. doi:10.1186/1476-7961-4-8
- Vargas-Villarreal, J., Mata-Cárdenas, B. D., Hernández-García, M. E., Garza-González, J. N., De La Garza-Salinas, L. H., & González-Salazar, F. (2014). Modified PEHPS medium as an alternative for the in vitro culture of *Giardia lamblia*. *BioMed Research International*, 2014. doi:10.1155/2014/714173
- Vázquez, F., García, M. J., Pérez, F., & Palacio, V. (2001). *Trichomonas vaginalis*: Tratamiento y resistencia a nitroimidazoles. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 19(3), 114–124. doi:10.1016/S0213-005X(01)72580-3
- Vercruysse, J., Schetters, T. P. M., Knox, D. P., Willadsen, P., & Claerebout, E. (2007). Control of parasitic disease using vaccines: an answer to drug resistance? *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 26(1), 105–115.
- Viney, M. (2017). Strongyloides. *Parasitology*, 144(3), 259–262. doi:10.1017/S0031182016001773
- Viney, M., & Kikuchi, T. (2017). Strongyloides ratti and S. venezuelensis - Rodent models of Strongyloides infection. *Parasitology*, 144(3), 285–294. doi:10.1017/S0031182016000020
- Vinjamuri, S., Shanker, D., Ramesh, R., & Nagarajan, S. (2015). In vitro evaluation of hemolytic activity and cell viability assay of hexanoic extracts of *Bridelia ferruginea* Benth. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(07), 1263–1268.
- von Samson-Himmelstjerna, G. (2012). Anthelmintic resistance in equine parasites – detection, potential clinical relevance and implications for control. *Veterinary Parasitology*, 185(1), 2–8. doi:10.1016/J.VETPAR.2011.10.010
- Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A.-K., & Zweck, A. (2006). The emerging nanomedicine landscape. *Nature Biotechnology*, 24(10), 1211–1217. doi:10.1038/nbt1006-1211
- Wang, C., Xu, J., Zhou, X., Li, J., Yan, G., James, A. A., & Chen, X. (2013). Review: Strongyloidiasis: An emerging infectious disease in China. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(3), 420–425. doi:10.4269/ajtmh.12-0596
- Wang, W., Wang, L., & Liang, Y. S. (2012). Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: A review. *Parasitology Research*, 111(5), 1871–1877. doi:10.1007/s00436-012-3151-z
- Wang, Y., Li, P., Tran, T. T., Zhang, J., & Kong, L. (2016). Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer, (February). doi:10.3390/nano6020026
- Wassmann, C., Hellberg, A., Tannich, E., & Bruchhaus, I. (1999). Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(37), 26051–26056. doi:10.1074/jbc.274.37.26051
- Wells, T. N. C. (2011). Natural products as starting points for future anti-malarial therapies : going back to our roots ?, 10(Suppl 1), 1–12.
- Wendel, K. A., & Workowski, K. A. (2007). Trichomoniasis : Challenges to Appropriate Management, 80012, 123–129. doi:10.1086/511425
- White, M. A. F., Whitley, H., & Ross, K. E. (2019). Sources Worldwide.

- Willcox, M. L., Graz, B., Falquet, J., Sidib, O., Forster, M., & Diallo, D. (2007). Argemone mexicana decoction for the treatment of uncomplicated falciparum malaria, 1190–1198. doi:10.1016/j.trstmh.2007.05.017
- World Health Organization. (2017). *GUIDELINE: PREVENTIVE CHEMOTHERAPY TO CONTROL SOIL-TRANSMITTED HELMINTH INFECTIONS IN AT-RISK POPULATION GROUPS WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Guideline: preventive chemotherapy to control soil-transmitted helminth infections in at-risk popul.* Retrieved from <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/258983/1/9789241550116-eng.pdf?ua=1>
- Wright, C. W., Marshall, S. J., Russell, P. F., Anderson, M. M., Phillipson, J. D., Kirby, G. C., ... Schiff, J. L. (2000). In vitro antiplasmodial, antiamoebic, and cytotoxic activities of some monomeric isoquinoline alkaloids. *Journal of Natural Products*, 63(12), 1638–1640. doi:10.1021/np000144r
- Xiao, C. W., Ji, Q. A., Wei, Q., Liu, Y., & Bao, G. L. (2015). Antifungal activity of berberine hydrochloride and palmatine hydrochloride against *Microsporum canis* -induced dermatitis in rabbits and underlying mechanism. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1–15. doi:10.1186/s12906-015-0680-x
- Xie, S., Pan, B., Shi, B., Zhang, Z., Zhang, X., Wang, M., & Zhou, W. (2011). Solid lipid nanoparticle suspension enhanced the therapeutic efficacy of praziquantel against tapeworm. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 2367–2374.
- Xie, S., Pan, B., Wang, M., Zhu, L., Wang, F., Dong, Z., ... Zhou, W. (2010). Formulation, characterization and pharmacokinetics of praziquantel-loaded hydrogenated castor oil solid lipid nanoparticles. *Nanomedicine (London, England)*, 5(5), 693–701. doi:10.2217/nnm.10.42
- Ximénez, C., Morán, P., Ramos, F., & Ramiro, M. (2007). Amibiasis intestinal: Estado actual del conocimiento. *Medicina Interna de Mexico*, 23(5), 398–407.
- Xool-tamayo, J. F., Monforte-gonzález, M., Rubio-piña, J., Mirón-lópez, G., & Vázquez-flota, F. (2017). Phytochemistry Letters Early developmental onset of alkaloid biosynthesis in Mexican poppy (*Argemone mexicana* L) Papaveraceae. *Phytochemistry Letters*, 20, 300–305. doi:10.1016/j.phytol.2016.12.020
- Ye, C., & Chi, H. (2018). Materials Science & Engineering C A review of recent progress in drug and protein encapsulation : Approaches , applications and challenges. *Materials Science & Engineering C*, 83(October 2017), 233–246. doi:10.1016/j.msec.2017.10.003
- Yepes, E., Varela-M, R. E., López-Abán, J., Dakir, E. L. H., Mollinedo, F., & Muro, A. (2014). In vitro and in vivo anti-schistosomal activity of the alkylphospholipid analog edelfosine. *PLoS ONE*, 9(10). doi:10.1371/journal.pone.0109431
- Yepes, E., Varela-M, R. E., López-Abán, J., Rojas-Caraballo, J., Muro, A., & Mollinedo, F. (2015). Inhibition of granulomatous inflammation and prophylactic treatment of schistosomiasis with a combination of edelfosine and Praziquantel. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(7), 1–22. doi:10.1371/journal.pntd.0003893
- Zamilpa, A., Jasso, G., Miguel, C., & Becerril, P. (2017). Microbial Pathogenesis In vitro assessment of *Argemone mexicana* , *Taraxacum officinale* , *Ruta chalepensis* and *Tagetes filifolia* against *Haemonchus contortus* nematode eggs and infective (L3) larvae, 109, 162–168. doi:10.1016/j.micpath.2017.05.048
- Zarei, A., Changizi-Ashtiyani, S., Taheri, S., & Ramezani, M. (2015). A quick overview on some aspects of endocrinological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* L. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 5(6), 485–497.
- Zeng, Q. zhen, Yang, F., Li, C. guang, Xu, L. hui, He, X. hui, Mai, F. yi, ... Ouyang, D. yun. (2019). Paclitaxel enhances the innate immunity by promoting NLRP3 inflammasome activation in macrophages. *Frontiers in Immunology*, 10(JAN), 1–17. doi:10.3389/fimmu.2019.00072
- Zoni, A. C., Catalá, L., & Ault, S. K. (2016). Schistosomiasis Prevalence and Intensity of Infection in Latin America and the Caribbean Countries, 1942-2014: A Systematic Review in the Context of a Regional Elimination Goal. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), 1–22. doi:10.1371/journal.pntd.0004493

9 ANEXOS

9.1 MEDIOS DE CULTIVO

9.1.1 Medio PEHPS

Se mezclarán los componentes para dicho medio y se disuelven en 750 mL de agua desionizada. El pH se ajusta a 7.0 con NaOH 10 N y es aforado a 1 L con agua desionizada estéril. Se colocan 5 mL del medio en tubos de 13 x 100 mm con tapón de rosca (Corning Co., Germany). El medio se esteriliza en autoclave por 15 min a 121 °C/15 lb de presión. Almacenamos a temperatura ambiente hasta su uso (Mata-Cárdenas et al., 2008). La composición del medio PEHPS se encuentra en la tabla 11.

Tabla 11. Composición del medio PEHPS

Extracto de hígado-páncreas	250 mL
Peptona de caseína	20 g
Ácido ascórbico	1 g
Cisteína	1 g
Glucosa	6 g
K ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	0.6 g

Saíd-Fernández *et al.*, 1988

9.1.2 Extracto hígado-páncreas

Se utilizan 4.0 kg de hígado bovino, el cuál es lavado y cortado; 1.4 kg de páncreas bovino y 1.4 kg de páncreas de cerdo, ambos libres de tejido conectivo y grasa. Se corta en trozos todo el material biológico y es puesto en un molino eléctrico, repitiendo este paso, para que la mezcla sea homogénea y libre de grandes trozos. Se licua dicha mezcla con PBS, aproximadamente 1.3 volúmenes de PBS por volumen de tejido y se ajusta el pH a 8.0 con NaOH 10 N. La mezcla obtenida es incubada 4 horas a 37 °C, posteriormente se calienta con agitación moderada, hasta que empiece a hervir, para evitar que la espuma se derrame y se esterilizara a 121 °C por 15 min,

después de este tiempo, se deja enfriar y se almacena en refrigeración durante toda la noche. Por la mañana se extrae el sobrenadante y se esteriliza de nuevo, el homogenizado es filtrado en un sándwich de tierras de diatomeas, primero se formará una capa con tierra rosa y posteriormente se mezcla el extracto caliente con la tierra blanca para formar la siguiente capa y filtraremos usando vacío. El extracto obtenido se almacena a -20 °C hasta su uso.

9.1.3 Suero bovino

La sangre se colecta en el rastro municipal de la ciudad de Monterrey y se deja coagular a 37 °C por 12 h, el suero es separado por centrifugación a 3,500 rpm por 15 min. Después el suero se prefiltra con papel Whatman N°1 (Whatman® Merck KGaA, Germany) y se vuelve a pasar por una serie de filtros Millipore (Beford, MA, USA) de 5 a 0.22 m, finalmente se esteriliza por filtración al vacío con filtros de 0.22 mm. El suero estéril se descomplementa por calentamiento a 56° C por 30 min, se deja enfriar a temperatura ambiente después se le añade 25 mL de mezcla de vitaminas 107 de Diamond (JRH Biosciences, Lenexa, KS) por cada litro de suero. El suero se distribuye en alícuotas de 100 mL, en botellas ámbar, estériles, de vidrio con tapón de rosca y se almacena a -20 °C (Vargas-Villarreal et al., 2014).

9.1.4 Medio de cultivo RPMI – 1640 SFB 10 %

Se atempera el medio y se agrega 10 % se SFB inactivado previamente a 56 °C, se homogeniza y después se agrega L – Glutamina + 100 UI/mL de penicilina (2 mM) y 100 UI/mL de estreptomicina (2 mM).

9.2 RESUMEN BIOGRÁFICO

M.C. JOEL HORACIO ELIZONDO LUEVANO

Candidato al grado de

**Doctor en Ciencias con Acentuación en Química de Productos Naturales, por parte de la
Universidad Autónoma de Nuevo León**

Doctor en Salud y Desarrollo en los Trópicos, por parte de la Universidad de Salamanca

Tesis: EVALUACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FRACCIONES CON
ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE *Argemone mexicana* L. Y *Kalanchoe daigremontiana*
Raym. - Hamet & H.Perrier

Campo de estudio: Química biológica y parasitología


Datos personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, México, el 13 de julio de 1986. Hijo de
Horacio Elizondo Martínez y María Guadalupe Luevano Espericueta.

Educación:

2009. Químico Bacteriólogo Parasitólogo. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL.

2014. Maestro en Ciencias con Acentuación en Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas.
UANL.

9.3 CONGRESOS



100 años
UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Ciudad de México, capital de los mexicanos

LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Y LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE INVESTIGACIÓN EN PRODUCTOS NATURALES
extiende la presente


CONSTANCIA


A: Joel H. Elizondo-Luevano, Rocío Castro Ríos, Marco A. Guzman-Lucio, Mayra Gómez-Govea, Abelardo Chávez-Montes



Por su valiosa asistencia y presentación de la ponencia en Modalidad Cartel

Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto metanólico de *Kalanchoe daigremontiana*

En la 13a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales
celebrada del 17 al 20 de mayo de 2017 en Morelia, Michoacán, México.


Dra. Rosa Ziva Norma del Río Torres
Presidente del Comité Organizador


Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez
Presidente de AMIPRONAT



UNIVERSIDAD MICHUACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Cento de años, cental de promesas

LA UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Y LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE INVESTIGACIÓN EN PRODUCTOS NATURALES

extiende la presente

CONSTANCIA

A: Alejandra Pacheco-Ordaz, Magda E. Hernández-García, Julia Verde-Star, Rocío Castro-Rios, Joel H. Elizondo-Luévano, Abelardo Chávez-Montes

Por su valiosa asistencia y presentación de la ponencia en Modalidad Cartel

Actividad antiparasitaria *in vitro* de los extractos de *Berberis vulgaris* y *Curcuma longa* incorporados en nanopartículas contra *T. vaginalis*

En la 13a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales celebrada del 17 al 20 de mayo de 2017 en Morelia, Michoacán, México.




INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNAM




Amipronat



CONACYT



Dra. Rosa Elva Norma del Río Torres
Presidente del Comité Organizador



Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez
Presidente de AMIPRONAT

La Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León
a través de la Subdirección de Investigación otorga
la presente

CONSTANCIA

MC Joel Horacio Elizondo Luevano, Dra. Azucena del Carmen Gonzales Horta, Dr. Rocío Castro Ríos,
Dr.C. Magda Elizabeth Hernández García, Dr. Abelardo Chavez montes

por la presentación en **OBAL** del trabajo titulado:

**"DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CON DIFERENTES POLÍMEROS PARA LA ENCAPSULACIÓN, PROTECCIÓN Y LIBERACIÓN
DE QUERCETINA"**



XXIX CONGRESO NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

**"Translational Medicine,
From Bench to Bedside"**

Llevado a cabo del 4 al 7 de Octubre de 2017
en Monterrey, N.L. México
"Alere Flammam Veritatis"

Dr. med. Edelmiro Pérez Rodríguez
Director



Dr. C. Guillermo Elizondo Riojas
Secretario de Fomento a la Investigación



Dr. med. José Gerardo González
Subdirector de Investigación



Dr. med. Conrado Treviño Garza
Coordinador's X XIX Congreso Nacional
de Investigación en Medicina



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



CA-QB

CUERPO ACADÉMICO DE QUÍMICA BIOLÓGICA



FCB

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Otorgan el presente RECONOCIMIENTO a:

Joel H. Elizondo-L., Magda E. Hernández-G, Julia Verde S., Ma. Adriana Núñez G., Azucena del C. González-H., Rocío Castro R., Eduardo Sánchez G. y Abelardo Chávez M

Por su destacada participación en la sesión de **POSTER** con el trabajo intitulado:
“Evaluación, identificación y caracterización de fracciones con actividad antiparasitaria de especies de *Kalanchoe daigremontiana*, *Syzygium aromaticum* y *Prunus dulcis*” dentro del 3er TALLERACADÉMICO “Dr. Baltazar Cuevas Hernández” celebrado en esta Facultad del 21 al 24 de Noviembre del 2017.

«ALERE FLAMMAM VERITATIS»

«ALERE FLAMMAM VERITATIS»

Dr. José Ignacio González Rojas

Dr. José Ignacio González Rojas
Subdirector Académico

Dr. Sergio A. Galindo Rodríguez

Dr. Sergio A. Galindo Rodríguez
Líder CA Química Biológica

Poster presentation certificate

This is to certify that

JOEL H. ELIZONDO-LUEVANO

has presented the poster entitled: "*Antiamoebic activity of Argemone mexicana against trophozoites of Entamoeba histolytica*" of the authors: Joel H. ELIZONDO-LUEVANO, Rocío CASTRO-RÍOS, Azucena GONZÁLEZ-HORTA, Eduardo SÁNCHEZ-GARCÍA, Magda E. HERNÁNDEZ-GARCÍA and Abelardo CHÁVEZ-MONTES, at the the 1st Global Congress of Pharmacy Faculties. *Innovation in Pharmacy: Advances and Perspectives (IPAP2018)*, held at the University of Salamanca, Spain, from September 25th to 28th, 2018.

We wish to express our gratitude for sharing your valuable contribution.

Sincerely,



Salamanca, September 28th, 2018

Antonio Muro Álvarez
IPAP2018 Conference Chair



***Innovation in Pharmacy:
Advances and Perspectives.***

Confirmation of attendance

This is to certify that

JOEL HORACIO ELIZONDO LUEVANO

has attended the 1st Global Congress of Pharmacy Faculties.
Innovation in Pharmacy: Advances and Perspectives (IPAP2018),
held at the University of Salamanca, Spain, from September 25th
to 28th, 2018.

Salamanca, September 28th, 2018

Sincerely,



Antonio Muro Álvarez
IPAP2018 Conference Chair

1st Global Congress of Pharmacy Faculties. September 24-28th, Salamanca, Spain 2018



XXVIII Congreso Nacional DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA



Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería

León, Guanajuato
23 al 28 de junio
2019

Otorga la presente

CONSTANCIA

A:

Joel Horacio Elizondo Luevano, Rocio Castro Ríos, Marco Antonio Guzmán Lucio, Eduardo Sánchez García, Julio López Abán, Antonio Muro Álvarez, Abelardo Chávez Montes

Por su participación con la contribución en cartel:

EFFECTO INHIBITORIO DE EXTRACTOS DE ARGEMONE MEXICANA L. EN CONTRA DE PARÁSITOS DE INTERES HUMANO

En el XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería,
23 al 28 de junio de 2019 en León, Guanajuato, México.



Dr. Adelfo Escalante Lozada
Presidente de la SMBB



Dr. Jaime Ortega López
Presidente del Comité Organizador



Dra. Sylvie LeBorgne
Presidente del Comité Científico








XXVIII Congreso Nacional
DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA



Sociedad Mexicana de
Biotecnología y Bioingeniería

León, Guanajuato
23 al 28 de junio
2019

Otorga la presente

CONSTANCIA

A:

Joel Horacio Elizondo Luevano

Por su participación con la contribución en cartel:

**EFFECTO IN-VITRO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE ARGEMONE MEXICANA L. EN CONTRA
DE TROFOZOITOS DE TRICHOMONAS VAGINALIS.**

En el XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería,
23 al 28 de junio de 2019 en León, Guanajuato, México.



Dr. Adolfo Escalante Lozada
Presidente de la SMBS













Dr. Jaime Ortega López
Presidente del Comité Organizador



Dra. Sylvie LeBorgne
Presidente del Comité Científico
















Amipronat
Asociación Mexicana de Investigadores en Productos Naturales



**16ª Reunión Internacional de
Investigación en Productos Naturales**
Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez

Estimado Joel Horacio Elizondo Luevano

ESTUDIANTE - SOCIO (CERTAMEN DE INVESTIGACIÓN ESTUDIANTIL)

DICTAMEN
TRABAJOS LIBRES

Por este conducto, le informamos que su trabajo titulado "Evaluación del efecto citotóxico y antiparasitario in-vitro del extracto de Argemone mexicana en contra de Strongyloides venezuelensis", ha sido dictaminado como "Aceptado" para participar en la modalidad de CARTEL, en el área de especialización: *Farmacognosia y etnobotánica (FE)*, dentro de las actividades de la 16ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, en el cual se ofrece un homenaje a la Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez por su trayectoria en la Investigación en el área de Productos Naturales; la reunión se efectuará en la ciudad de Zacatecas, Zacatecas en el segundo semestre del año en curso; gestionando en la medida de lo posible que la celebración se realice en las últimas semanas del mes de octubre del 2020. El cambio de fecha atiende a la contingencia sanitaria por COVID-19, y en cuanto se tenga la fecha definitiva de la reunión, se les enviará una carta en la cual se establezcan los datos formales para permitirles realizar los trámites institucionales que tengan lugar, quedando entonces formalizada su carta de aceptación.

Aprovechamos la ocasión para recordar que todas las personas que asistirán al evento deben registrarse como participantes en la plataforma de la 16ª RIIPN y haber cubierto su cuota de inscripción correspondiente.

Así mismo, les invitamos a continuar atentos a las actualizaciones de nuestra página y redes sociales: <http://16riipn-zacatecas2020.com.mx/>. Recordándoles que las constancias de participación se generarán de acuerdo con la información ingresada en la plataforma de registro de trabajos libres (título del trabajo y coautores).

Agradecemos su interés por participar en la 16ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales.

ATENTAMENTE

Zacatecas, Zac., 12 de abril de 2020

Dra. Margarita L. Martínez-Fierro

Coordinadora del Comité Científico de la 16ª RIIPN

Dra. Virginia Flores-Morales

Presidenta del Comité Local de la 16ª RIIPN



<http://16riipn-zacatecas2020.com.mx/>

16ª RIIPN Zacatecas 2020





COMUNICADO

15 de junio, 2020

Estimados Profesionistas, Estudiantes, Ponentes, Patrocinadores y Medios de Comunicación participantes de la 16ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales (16ª RIIPN):

El Consejo Directivo de la AMIPRONAT y el Comité Organizador Local de la 16ª RIIPN desean que todos Ustedes y sus familias se encuentren muy bien de salud y resguardados ante la contingencia ocasionada por la pandemia de COVID-19, que padecemos desde principios de marzo del presente año.

Hasta el momento, hemos pasado las diferentes fases del confinamiento y entramos a una nueva etapa que el Gobierno de México denomina “Nueva Normalidad” en donde, las actividades están determinadas por el sistema de vigilancia de salud que se denominó “Sistema de Semáforo Epidemiológico COVID-19”. De acuerdo con este sistema de clasificación un semáforo en verde indica que se tienen condiciones sanitarias aceptables en la mayoría de los estados, esto pudiera suceder hasta septiembre del presente año sin tener al día de hoy total certeza de las condiciones que prevalezcan.

Ante esta circunstancia y pensando en resguardar la salud de nuestra comunidad, el Consejo Directivo de la AMIPRONAT y el Comité Organizador Local de la Universidad Autónoma de Zacatecas ha decidido que la 16ª. RIIPN del presente año se suspende y se llevará cabo del 17 al 22 de mayo del 2021, en la misma sede, Zacatecas.

Apreciamos sinceramente su comprensión y reiteramos nuestro compromiso con todos Ustedes miembros de nuestra comunidad Científica y les pedimos mantener el entusiasmo en que unidos todos: México y el mundo entero, saldremos adelante de esta emergencia sanitaria.

Los invitamos a permanecer atentos a los comunicados que publicaremos mediante nuestros portales web de la AMIPRONAT y de 16aRIIPN, así como de las redes sociales oficiales. Así mismo, reiteramos nuestro compromiso de dar respuesta, de manera gradual, a todas las dudas que surjan al respecto.

ATENTAMENTE

Comité Organizador Local 16ª RIIPN
Consejo Directivo de AMIPRONAT

🌐 www.16riipn-zacatecas2020.com.mx/ www.amipronat.org.mx/ @RIIPN_ZAC2020, @amipronat
 @16RIIPNZacatecas2020, @amipronat @amipronat2019

16ª RIIPN Zacatecas 2021





UADY
UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
DE YUCATÁN

**CENTRO DE INVESTIGACIONES
REGIONALES "DR. HIDEYO NOGUCHI"**

UNIDAD DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

**1^{er} Encuentro sobre Enfermedades Tropicales
Del 1 al 3 de abril del 2020, Mérida, Yucatán.**

Mérida, Yucatán a 05 de marzo del 2020

COMITÉ ORGANIZADOR

*Secretaría Académica del
CIR
Dra. Eugenia Guzmán Marín*

*Coordinadora del evento
Dra. Nalleli Loria Cervera*

*Integrantes
M en C. Erika Sosa Bibiano
QFB. Karina López Ávila
Dr. Israel Chan Pérez*

Estimado: Joel H. Elizondo Luevano

A nombre del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" y del Comité Organizador, le agradecemos su interés en participar en el "1^{er} encuentro sobre Enfermedades Tropicales" que se celebrará del 1 al 3 de abril del 2020, con sede en el Centro Cultural Universitario de la Universidad Autónoma de Yucatán, en la ciudad de Mérida.

Así mismo le informamos que su trabajo titulado:

Efecto *in-vitro* de *Argemone mexicana* (amapola mexicana) y su compuesto principal, berberina contra *Strongyloides venezuelensis*

Autores: Joel Horacio Elizondo-Luévano, Eduardo Sánchez-García, Rocío Castro-Ríos, Julio López-Abán, Antonio Muro-Álvarez, Oscar Gorgojo-Galindo, Abelardo Chávez-Montes.

ha sido aceptado en la modalidad de cartel, por lo que le pedimos colocarlo el día miércoles 01 de abril entre 8:00 y 9:00 de la mañana en el espacio número 02. Su trabajo será evaluado el día miércoles de 12:30 a 13:30 h, favor de permanecer en ese horario junto a su cartel para presentar su trabajo ante los evaluadores. Los carteles podrán retirarse al finalizar el evento el día viernes 03 de abril.

Agradeciendo la atención a la presente, le enviamos un cordial saludo.

Atentamente

Comité organizador

1er. Encuentro Sobre Enfermedades Tropicales

Avenida Itzaes No. 490 x 59, Centro C.P. 97000 | 924 57 55
Mérida, Yucatán, México | www.cirbiomedicas.uady.mx



Otorga a:

Joel H. Elizondo Luévano

el presente

Reconocimiento

*Por su participación en la Sesión de Pósters Quorum 2020
con el trabajo de investigación:*

**“DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS A
BASE DE POLIMEROS EUDRAGIT®, CON APLICACIÓN
FARMACÉUTICA MEDIANTE NANO - PRECIPITACIÓN”**

Querétaro, Qro. a 04 de octubre de 2020

Dra. Grisel Fierros Romero
Directora de Ingeniería en Biotecnología
Tecnológico de Monterrey Campus Querétaro

Joana Lizeth Hernández Lara
Presidente del 9no. Congreso Quorum
Tecnológico de Monterrey Campus Querétaro



Otorga a:

Joel H. Elizondo Luévano

el presente

Reconocimiento

*Por su participación en la Sesión de Pósters Quorum 2020
con el trabajo de investigación:*

**“Nanotecnología aplicada en el desarrollo de
un tratamiento profiláctico para osteomielitis”**

Querétaro, Qro. a 04 de octubre de 2020

Dra. Griselda Fierros Romero
Directora de Ingeniería en Biotecnología
Tecnológico de Monterrey Campus Querétaro

Joana Lizeth Hernández Lara
Presidente del 9no. Congreso Quorum
Tecnológico de Monterrey Campus Querétaro

9.4 ESTANCIAS DE INVESTIGACION



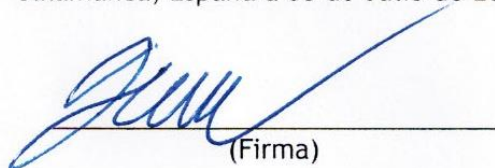
CARTA DE ACEPTACIÓN

D./D^a. Joel Horacio Elizondo Luevano., con pasaporte nº G16194032, y nacionalidad: Mexicana, que ha resultado beneficiado/a en la *Convocatoria de Becas para realizar estudios de Doctorado en la Universidad de Salamanca destinadas a estudiantes latinoamericanos*, de fecha 29 de abril de 2019 para dar cumplimiento a lo exigido en dicha Convocatoria, mediante la presente carta acepto las normas y condiciones que con carácter general se señalan:

- Efectuar los estudios previstos conforme a la solicitud presentada, atendiendo a las orientaciones que reciban de los tutores o directores y mantener durante todo el periodo de la beca la actitud e interés necesarios para el buen aprovechamiento de su formación.
- Cumplimentar y remitir los formularios, informes y demás documentos, en la forma y contenidos que le sean notificados, así como asistir a las reuniones y entrevistas a las que sea convocado por la Comisión de Seguimiento del Programa.
- Comunicar cualquier incidencia que pueda afectar al desarrollo de los objetivos de la ayuda al Servicio de Relaciones Internacionales, así como las ausencias de la Universidad. En caso de renuncia, ésta deberá realizarse al menos con 10 días de antelación.
- Hacer un uso adecuado de las instalaciones y dependencias universitarias.

Así mismo me comprometo a aceptar los criterios y decisiones de la Comisión de Seguimiento del Programa ante las dudas interpretativas que pudieran surgir sobre condiciones, gestión o tramitación de estas ayudas.

Salamanca, España a 08 de Julio de 2019


(Firma)

M^a TERESA HERNÁNDEZ GALLEGO, Jefa del Servicio de Relaciones Internacionales de la Universidad de Salamanca, tiene el gusto de comunicar al estudiante D.

JOEL HORACIO ELIZONDO LUEVANO

Con pasaporte G16194032, que le ha sido adjudicada la beca para realizar estudios de Doctorado en la Universidad de Salamanca durante el curso académico 2019/2020, como becario de la “*Convocatoria de becas para realizar estudios de Doctorado en la Universidad de Salamanca destinadas a estudiantes latinoamericanos*”, de fecha 29 de abril de 2019. EL estudiante deberá cumplir los requisitos exigidos en la Escuela de Doctorado de la Universidad de Salamanca para hacer efectiva su matrícula en los referidos estudios.

De acuerdo con dicha Convocatoria la Universidad de Salamanca se hará cargo durante el curso 2019/2020 de los gastos del estudiante que se relacionan:

- Exención de tasas de matrícula (servicios académicos).
- 9 mensualidades de 600 € para gastos de residencia y manutención.
- Seguro médico, de accidentes y de responsabilidad civil (desde el 1 de septiembre de 2019 hasta el 31 de agosto de 2020).

Salamanca, 12 de julio de 2019



En relación con la “Convocatoria de Ayudas para asistencia y participación en congresos destinada a estudiantes de Doctorado matriculados en el curso académico 2019-2020”, de fecha 7 de febrero de 2020, a la vista de las propuestas de las comisiones Académicas de los programas de Doctorado, este vicerrectorado de Postgrado y Planes Especiales en Ciencias de la Salud,

RESUELVE:

La concesión de las Ayudas, en los términos establecidos en las bases de la convocatoria, a los siguientes estudiantes de programas de Doctorado por orden de prelación:

Salud y desarrollo en los Trópicos.	1. MONSALVE ARTEAGA, Lía Carolina	400 €
	2. LARQUÉ GARCÍA, Horacio	400 €
	3. LAMARQUE, Muriel Soledad	400 €
	4. ELIZONDO LUÉVANO, Joel Horacio	400 €
	5. MUÑOZ ZAMBRANO, María Elena	400 €
	6. SAULESLEJA, Sofía	400 €

9.5 PUBLICACIONES

2018. In Vitro Study of Antiamoebic Activity of Methanol Extracts of *Argemone mexicana* on Trophozoites of *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. Elizondo Luévano, Joel Horacio., Castro Ríos, Rocío., Sánchez García, Eduardo., Hernández García, Magda Elizabeth., Vargas Villarreal, Javier., Rodríguez Luis, Osvelia Esmeralda y Chávez Montes, Abelardo. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2018. pp. 1-8. ISSN 1712-9532. <http://doi.org/10.1155/2018/7453787>

2020. In Vitro Effect of Methanolic Extract of *Argemone mexicana* against *Trichomonas vaginalis*. Elizondo Luévano, Joel Horacio., Verde Star, Julia., González Horta, Azucena., Castro Ríos, Rocío., Hernández García, Magda Elizabeth y Chávez Montes, Abelardo. *Korean Journal of Parasitology* Vol. 58, No. 2: 135-145, April 2020 ISSN (Print) 0023-4001 ISSN (Online) 1738-0006. <https://doi.org/10.3347/kjp.2020.58.2.135>

2020. Berberine, curcumin and quercetin as potential antiparasitic agents. Elizondo Luévano, Joel Horacio, Hernández García, Magda Elizabeth., Pérez Narváez, Oscar Alberto, Castro Ríos, Rocío, & Chávez Montes, Abelardo. *Revista de Biología Tropical*, 2020. 68(4), 1241-1249. <https://doi.org/10.15517/RBT.V68I4.42094>

2020. Berberine: A nematocidal alkaloid from *Argemone mexicana* against *Strongyloides venezuelensis*. Joel H. Elizondo-Luévano, Rocío Castro-Ríos, Julio López-Abán, Oscar Gorgojo-Galindo, Pedro Fernández-Soto, Belén Vicente, Antonio Muro, Abelardo Chávez-Montes. *Experimental Parasitology*.

2020. Eudragit® Polymeric Nanoparticles by Nanoprecipitation: Influence of basic variables. Joel Horacio Elizondo-Luévano, Eduardo Sánchez-García, María Julia Verde-Star, Rocío Castro-Ríos, Abelardo Chávez-Montes. *SN Applied Sciences*.

Research Article

In Vitro Study of Antiamoebic Activity of Methanol Extracts of *Argemone mexicana* on Trophozoites of *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS

Joel H. Elizondo-Luévano ¹, Rocío Castro-Ríos,² Eduardo Sánchez-García,¹ Magda E. Hernández-García ³, Javier Vargas-Villarreal ³, Osvelia E. Rodríguez-Luis,¹ and Abelardo Chávez-Montes ¹

¹Departamento de Química, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ciudad Universitaria, 66455 San Nicolás de los Garza, NL, Mexico

²Departamento de Química Analítica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, 64460 Monterrey, NL, Mexico

³Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), 64720 Monterrey, NL, Mexico

Correspondence should be addressed to Abelardo Chávez-Montes; abelardo.chavezmn@uanl.edu.mx

Received 11 April 2018; Accepted 9 July 2018; Published 30 July 2018

Academic Editor: Mario Dell'Agli

Copyright © 2018 Joel H. Elizondo-Luévano et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Infections caused by parasites in humans represent one of the main public health concerns. Amoebiasis, a parasitic infection caused by *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), is considered endemic in Mexico, where *Argemone mexicana* (*A. mexicana*) has been used in traditional medicine to treat intestinal parasitic diseases. The objective of this work was to evaluate the potential biological activity of *A. mexicana* on *E. histolytica*. For this purpose, a methanolic extract was prepared from *A. mexicana* leaves, and a differential fractionation was carried out with solvents of different polarities. The inhibitory capacities of the extract and its fractions were evaluated in vitro using HM1-IMSS, a strain of *Entamoeba histolytica*. *A. mexicana* extract was found to have a growth-inhibiting activity for *E. histolytica*, showing $IC_{50} = 78.39 \mu\text{g/mL}$. The extract was characterized phytochemically, and the methanolic extract fractions were analyzed by liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS). Berberine and jatrorrhizine were present in the active fractions, and these compounds may be responsible for the antiparasitic activity. The identification of amoebicidal activity of *A. mexicana* on *E. histolytica* gives support to the traditional use. Further studies with berberine and jatrorrhizine will be carried out to understand the mechanism involved.

1. Introduction

Parasitosis represents a global health problem, with intestinal parasites being one of the main causes of morbidity. This type of disease is closely linked to poverty and poor hygienic and sanitary conditions, so it appears more frequently in developing countries, especially in geographical areas where the ecological conditions favor the persistence of parasite [1]. *E. histolytica* is one of the most common parasites and is the causative agent of human amoebiasis. Infections with this parasite have different clinical manifestations,

including diarrhea, dysentery, and liver abscess. Amoebiasis is acquired by ingesting *E. histolytica* cysts in contaminated food or water. This disease is a major health problem, according to the Global Burden of Disease Study conducted in 2013 [2]. Approximately 50 million people are affected by *E. histolytica* each year, and of these, approximately 100,000 die [3]. In fact, intestinal infections by protozoa, such as amoebiasis, are the third leading cause of death in the world.

The drug of first choice for treating amoebiasis is metronidazole, which interacts with the DNA of the protozoan [4], causing a loss of the helical structure and inhibiting the

synthesis of nucleic acids, ultimately resulting in cell death [5–7]. The therapeutic use of natural products is as old as human civilization, and the vast majority of people on the planet continue to rely on the therapeutic properties of plants. In addition, the search for active ingredients from medicinal plants continues to provide active ingredients for treating diseases [2]. The exploitation of this potential source of medicines requires ethnobotanical, ethnopharmacological, chemical, biological, pharmacological, and toxicological studies [8].

Argemone mexicana L. (Papaveraceae), also known as Mexican poppy, has a wide distribution in many tropical and subtropical countries [9], and it is common to find it on the edges of roads, in vacant lots and on the sides of train tracks. Various types of chemical constituents are present in this plant, although alkaloids are the most abundant [10]. In traditional medicine, different parts of this plant are used to treat chronic skin diseases, ulcers, asthma, and other intestinal conditions [11–13]. Studies have shown that the extracts of *A. mexicana* and some of its individual components are effective against bacteria, fungi, viruses, nematodes, and parasites [14–18].

Considering the properties and background of this plant in relation to different microorganisms as well as the ease of obtaining the plant, the main objective of this study was to evaluate the activity of the methanolic extract of leaves of *A. mexicana* in vitro against *E. histolytica* HM1-IMSS and to identify the components present in the fractions of the extract because *E. Histolytica* represents one of the main etiological agents worldwide.

2. Materials and Methods

2.1. Vegetal Material. The leaves of *A. mexicana* were collected in the city of Monterrey, Nuevo León, Mexico, in February 2017. The material was identified as *A. mexicana* by the Department of Botany of the Faculty of Biological Sciences of the Autonomous University of Nuevo León. A voucher specimen was deposited with voucher no. 1208882 in the Herbarium of the Faculty.

2.2. Extraction. To obtain the methanolic extract of *A. mexicana*, the leaves were dried at room temperature and subjected to extraction by maceration [19]. For this, a 100 g portion was milled to a fine powder, and successive extractions (5 × 250 mL) were made with absolute methanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) on an orbital shaker (Lab-line, 3508, Lab-line Instruments Inc., Melrose Park, IL, USA) at room temperature (24 h each). The obtained extract was filtered with Whatman no. 1 paper and concentrated under reduced pressure at 45°C using a rotary evaporator (Heidolph Rotary Evaporator, Laborota 4003, Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Germany). Then, the residual solvent was evaporated at room temperature. The solid extract obtained was weighed to calculate the yield percentage and stored at 4°C until further use.

2.3. Fractionation of the Methanol Extract of *A. mexicana*. Serial partitions of the solid extract were made using solvents of different polarities and reactivity rates (Merck KGaA,

Darmstadt, Germany). In the first stage, an extraction with hexane (3 × 100 L) was carried out, and the extracts were mixed and filtered with Whatman no. 1 paper (fraction A). The residue was extracted with 3 portions of 100 mL of CHCl₃ (fraction B) and filtered again with Whatman paper, and the residual solid absolute MeOH (4 × 100 mL) was extracted and filtered with Whatman no. 1 (fraction C). Then, 100 mL of methanol was added to the solid and subjected to heating (120°C) for 5 min with stirring, followed by filtration (fraction D). Finally, the resulting solid was solubilized with water (fraction E).

2.4. The Activity of the Methanol Extract of *A. mexicana* against *E. histolytica*. The antiprotozoal activity of the extract was carried out with the microassay technique as previously described [7]. In brief, a concentrated solution of crude methanolic extract and another of berberine (1 mg/mL) in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 5% v/v were prepared. This solution was sterilized by passing through a nylon membrane filter with a 0.22 µm pore size (Merck Millipore, KGaA, Darmstadt, Germany) and stored, protected from light, at 4°C until use. Serial dilutions were performed by taking 500 µL of the stock solution and adding 500 µL of sterile deionized water. The concentrations of these working solutions were 0.031, 0.062, 0.125, 0.25, and 0.5 mg/mL. In culture tubes (Vial, Bellco Biotechnology, Bellco Glass Inc., Vineland, NJ, USA) with 1 mL of TYI-S33, 2 × 10⁴ trophozoites of *E. histolytica* were deposited in the log phase, and 50 µL of working solution was added to each tube. The tubes were incubated at 36.6°C for 72 h. Metronidazole at a concentration of 0.124 µg/mL was used as a positive control, and 5% DMSO was used as a negative control. All bioassays were performed in triplicate and repeated three times [20]. After the incubation period, the tubes were cooled in ice water for 15 min, and the number of trophozoites per mL of each tube was counted with a hemocytometer (Neubauer, Hausser Scientific, Horsham, PA, USA).

2.5. Statistical Analysis. Growth inhibition percentages were estimated in reference to untreated controls. The extract concentration that would inhibit in 50% the *E. histolytica* growth, that is, IC₅₀ with 95% confidence limits [21], was calculated by probit analysis (SPSS 24.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The log dose (concentration) response relationship was used in order to obtain the linear probit model. A chi-square goodness of fit test was used for assessing probit model adequacy.

2.6. Phytochemical Tests. To determine the functional groups of the compounds present in the methanolic extract and its active fractions, conventional chemical tests were carried out [19]. These tests included 2,4-dinitrophenylhydrazine (carbonyl group), anthrone (carbohydrates), Baljet (sesquiterpene lactones), sodium bicarbonate (carboxyl group), ferric chloride (tannins), Dragendorff (alkaloids), Liebermann–Burchard (sterols and triterpenes), potassium permanganate

(double bonds), Shinoda (flavonoids), sodium hydroxide (coumarins), Bornträger (quinones), and sodium bicarbonate (saponins).

2.7. HPLC Analysis and Mass Spectrometry. Fractions C and D were analyzed by HPLC and MS. To do so, 15 mg of the dry fractions were obtained, dissolved in 2 mL of a mixture of methanol-acetonitrile (50:50), and filtered through a 0.2 µm nylon membrane (Millipore). For the analysis, a Dionex Ultimate 3000 UHPLC System (Thermo Fisher, Dreieich, Germany) with a UV-Vis detector and coupled to an LCQ Fleet mass spectrometer (Thermo Scientific) equipped with an electrospray ionization source and ion trap analyzer were used. The HPLC analysis was performed using a Kinetex PFP column (50 × 2.1 m, Phenomenex, USA). As the mobile phase, a mixture of an aqueous solution of formic acid (1%) and methanol was used, starting with 30% methanol and increasing linearly to 100% over 10 min, returning to the initial conditions in the 11th minute and conditioning for 15 min before the next injection. The mobile phase flow was 200 µL/min, the column was maintained at 50°C, and the injection volume used was 0.1 µL. Nitrogen was used at a flow of 40 units as a nebulization gas (sheath gas). Ionization was performed in a positive mode. The electrospray capillary voltage used was 5 kV, the desolvation capillary voltage was 43 V, and the temperature was 275°C. The lens tube voltage was set at 75 V. Data acquisition was performed in full-scan mode at *m/z* 50 to 70 and with mass/mass experiments used for the most intense ions in the collision-induced dissociation (CID) mode, adjusting the normalized collision energy to obtain an adequate fragmentation with an isolation width of 1 *m/z*, an activation RF voltage (activation *Q*) of 0.25, and an activation time of 30 ms. All experiments were performed in triplicate.

2.8. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR). ¹H-NMR and ¹³C-NMR experiments were carried out using a Bruker Avance III HD 400 (400 MHz) spectrometer equipped with gradients and a 5 mm multinuclear probe (Bruker Corp., Billerica, MA, USA). For analysis, 10 mg of berberine standard, the dried methanolic raw extract, and fractions C and D were dissolved in methanol-d₄ with 0.3% TMS as a zero reference. NMR spectra were analyzed using Topspin 3.0 software (Bruker Corp.)

3. Results and Discussion

The yield of methanol extracted by macerating (41.2 g) the dried leaf of *A. mexicana* was 9.95% p/p. As seen in Table 1, the extract was positive for unsaturation, sterols, triterpenes, quinones, tannins, saponins, carbohydrates, alkaloids, and flavonoids. These results coincide with those of previous studies, which have reported the presence of terpenoids, flavonoids, phenolics, long-chain aliphatic compounds, and a few aromatic compounds that are other constituents of this plant [8, 15]. However, it must be noted that the chemical composition of the plant may differ according to the parts of

TABLE 1: Chemical tests of the methanol extract of *Argemone mexicana*.

Phytochemical tests	
KMnO ₄ (double bonds)	+
2,4-dinitrophenylhydrazine (carbonyl group)	–
NaOH (coumarins)	–
Baljet (sesquiterpene lactones)	–
Bornträger (quinones)	+
Liebermann–Burchard (sterols and triterpenes)	+
NaHCO ₃ (carboxyl group)	–
Ferric chloride (tannins)	+
Saponins	+
Shinoda (flavonoids)	+
Anthrone (carbohydrates)	+
Dragendorff (alkaloids)	+

–: negative; +: positive.

the plant that are used, the harvest season, and the geographical area.

Before evaluating the activity of the extract, it was necessary to assess the growth kinetics of *E. histolytica* to determine the logarithmic phase. Its generation time was found to be 6.3 h, and its doubling time was 4.3 h. After 72 h, the exponential phase begins, in which the parasite enters a period characterized by cellular duplication and is in its most active metabolic phase [22].

The activity assays against *E. histolytica* showed the ability of *A. mexicana* methanol extract to inhibit the trophozoite growth of *E. histolytica* in in vitro cultures under axenic conditions. As shown in Figure 1, the percentage of inhibition increases with higher extract concentrations. In addition, a negative control consisting of culture medium with 5% DMSO was evaluated for how it dissolved the extract inoculated with *E. histolytica*, and a positive control consisting of culture medium, inoculum, and metronidazole at 1 µg/mL as well as a blank control containing the culture medium and inoculum was tested.

The results showed a response behavior corresponding to the dose: as the concentration of the extract increased, the viability decreased. At a concentration of 500 µg/mL, the inhibition was 96.6%. Even at the lowest test concentration of 15.6 µg/mL, the extract still showed 8.8% inhibition. The negative control and the inoculum control had no activity against the parasite, but the positive control showed 99.6% inhibition. The determination of the mean inhibitory concentration against trophozoites of *E. histolytica* by the probit test showed that the methanolic extract had an IC₅₀ of 78.39 ± 0.48 µg/mL (Figure 2), berberine of 40.65 ± 1.23 µg/mL, and that metronidazole had an IC₅₀ of 0.14 ± 0.02 µg/mL. The result of the probit analysis applied to these data gave a chi-square value of 16,217 (*P* = 0.300), which justifies that the data conform to the probit model, and the probit equations were obtained for each repetition: *P* = –3.929 + 2.09 (µg/mL), *P* = –3.935 + 2.09 (µg/mL), and *P* = –3.924 + 2.09 (µg/mL), highly significant results (*P* < 0.01).

Although there are no reports on the use of extracts of *A. mexicana* against *E. histolytica*, some studies have evaluated extracts of this plant against other parasites, such as

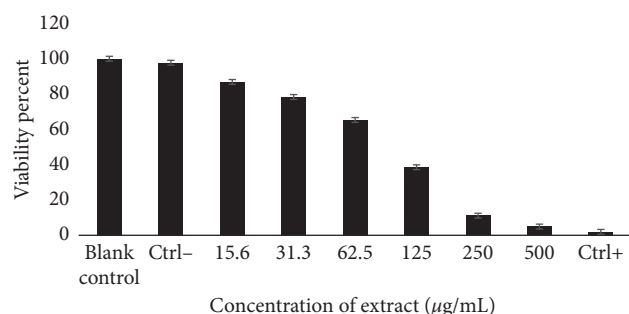


FIGURE 1: Evaluation of the viability of trophozoites of *E. histolytica*. Control: medium TYI-S33 inoculum of *E. histolytica*. Ctrl-: negative control (DMSO 5% inoculum of *E. histolytica*). Ctrl+: positive control (metronidazole 1 µg/mL). The error bars represent the standard deviation of measurements in triplicate and repeated three times ($n = 9$).

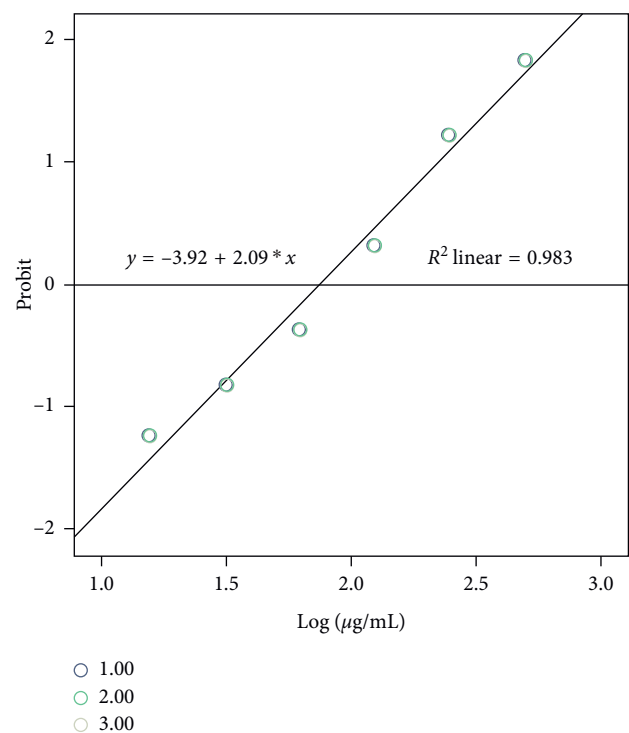


FIGURE 2: Probit graph of the activity of the methanol extract of *A. mexicana* against *E. histolytica* HM1-IMSS. The IC_{50} of the methanol extract of *A. mexicana* on *E. histolytica* in their trophozoite form is shown and was performed in triplicate. IC_{50} for the methanol extract of *A. mexicana* on *E. histolytica* in their trophozoite form was 78.39 ± 0.48 µg/mL.

nematodes [23]. The aqueous extract of leaves of *A. mexicana* exhibits significant anthelmintic activity against *Ascaridia galli* at a concentration of 100 µg/mL, and this aqueous extract has also been used as an anthelmintic against the earthworm *Pheritima posthuma* [20]. Antiparasitic capacity against *Plasmodium falciparum* has also been demonstrated [9, 24], as the aqueous extract of the aerial parts of the plant exhibits activity against the chloroquine-resistant strain, with an IC_{50} value of 5.89 µg/mL.

When the activity of the fractions of the methanolic extract was evaluated against the parasite, it was found that, at 125 µg/mL, fractions C and D presented lethality percentages of 72.39 and 79.09%, respectively. Thus, these fractions were cataloged as active because the other fractions showed no relevant activity against *E. histolytica*. The active fractions (C and D) were analyzed by UHPLC-MS. Among the compounds that were present in both fractions, two important signals at m/z 336 and 338 were found and MS/MS experiments were carried out. Fragmentation of ion at m/z 336 yielded fragments at m/z 321, 320, and 292, while product ions obtained for ion at m/z 338 were 323, 322, and 294. The MS/MS spectra are similar to those reported for berberine and jatrorrhizine. As an example, Figure 3 shows the chromatograms and corresponding mass spectra for fraction D. In order to confirm the presence of the abovementioned alkaloids, 1H -RMN and ^{13}C -RMN analysis were carried out for fractions C and D and the raw methanolic extract. For instance, in Figure 4, a comparison between the RMN spectra obtained for berberine, fraction D, and the raw methanolic extract is presented. As can be seen, for both the extract and fraction D, it is possible to observe the signals corresponding to berberine. The presence of jatrorrhizine could not be confirmed with these experiments, probably due to the low sensitivity of RMN, so further work on the isolation of the chromatographic peak that produces this signal will be made. These results agree with previous phytochemical investigations that revealed the presence of several alkaloids [11], including berberine, jatrorrhizine, protopine, allocryptopine, and sanguinarine. In addition, the plant produces more than 25 benzyloquinoline alkaloids [25].

The compounds found in fractions C and D are of the alkaloid type and are probably responsible for the activity, as their effectiveness has been shown in extracts from plants of other genera that have been tested against the following parasites: *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, and *E. histolytica* [26]. Specifically, several pharmacological effects and activity against a variety of bacteria, fungi, protozoa, helminths, and viruses have been reported for berberine [27]. It has been demonstrated that berberine possesses inhibitory activity against *G. lamblia* and *T. vaginalis*, and in axenic cultures, morphological changes have been observed in the parasites by exposing these parasites to alkaloids, which caused a grouping of the chromatin in the nucleus and formation of autophagic vacuoles and aggregates of small vacuoles in the cytoplasm [28]. Also, using animal models such as the Syrian hamster, it has been shown that berberine has an effect against promastigotes of *Leishmania panamensis* and *Leishmania major* [29]. In addition, in a study conducted in 2014 [30], the antileishmanial activity of berberine against promastigotes of *L. major* and *Leishmania tropica* was evaluated. The results revealed that berberine was effective in inhibiting *L. major* and *L. tropica* promastigotes growth in a dose-dependent manner with IC_{50} values varying from 2.1 to 26.6 µg/mL.

By contrast, jatrorrhizine, whose presence should be confirmed, is a protoberberinoid alkaloid and has been found in different plant species such as *Enantia chlorantha*

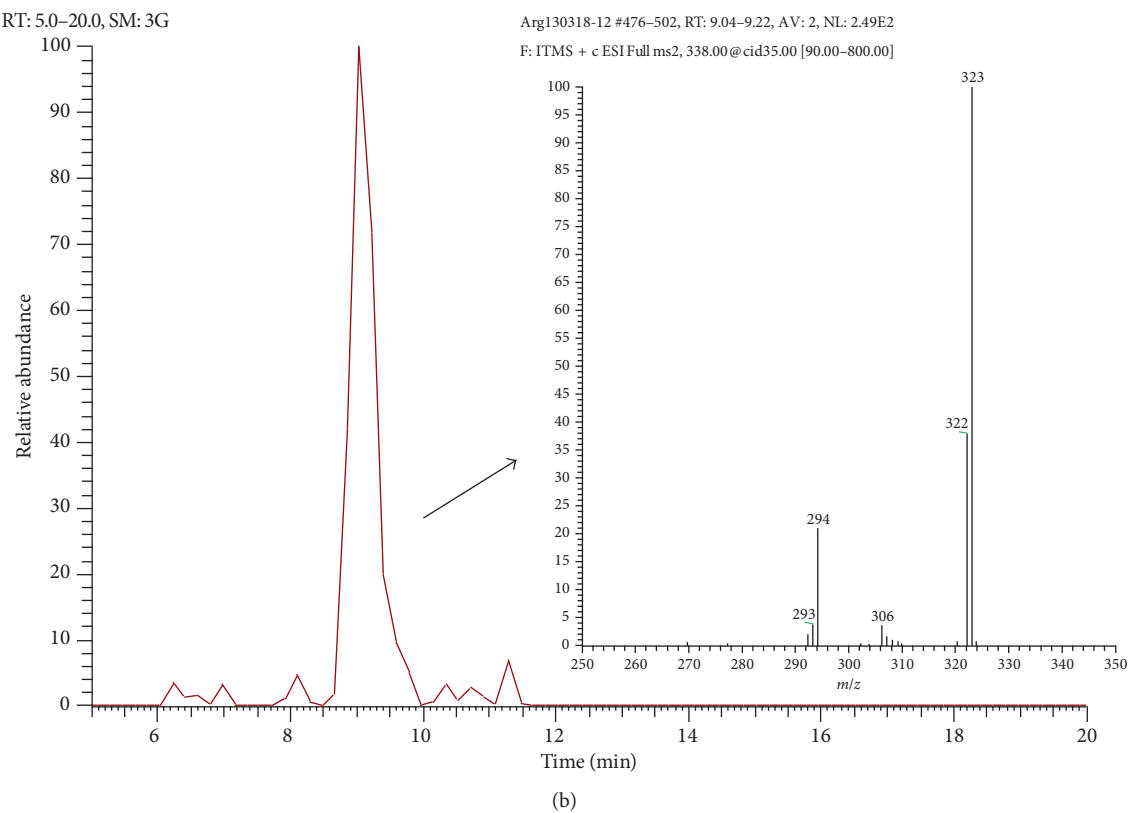
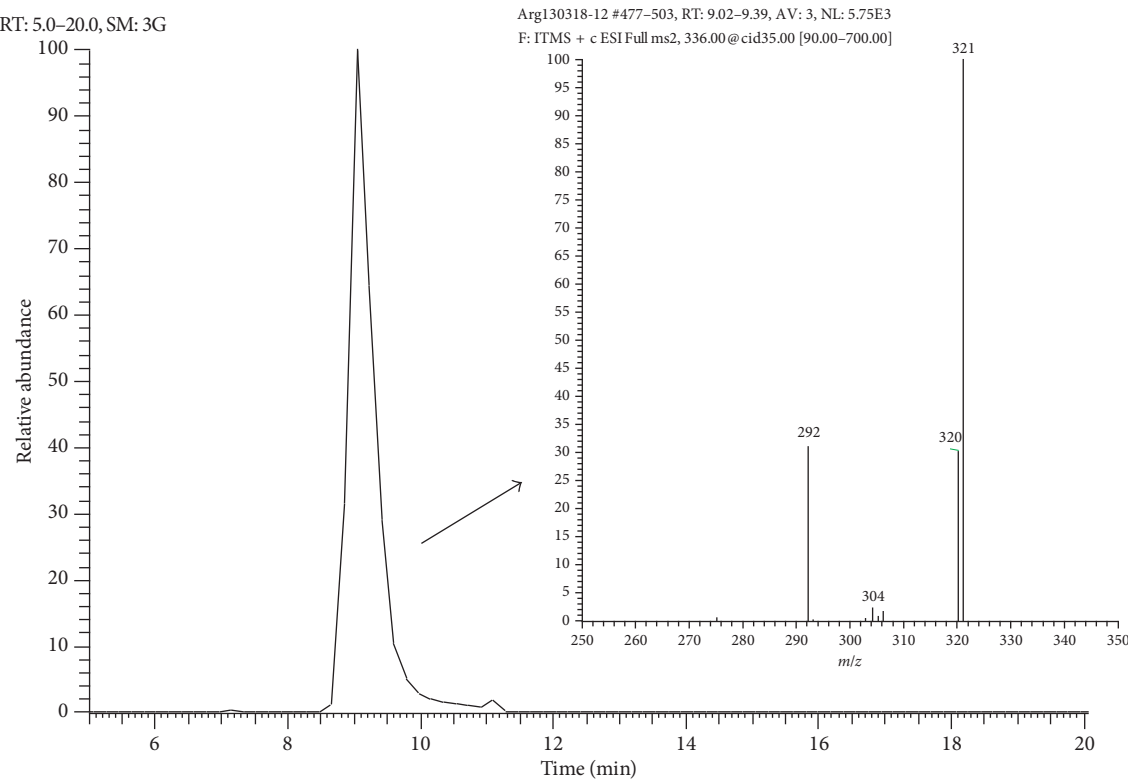


FIGURE 3: Chromatograms and mass spectra obtained for fraction D. LC-MS/MS fragmentogram and MS/MS spectra obtained for (a) berberine (m/z 336) and (b) jatrorrhizine (m/z 338) in fraction D.

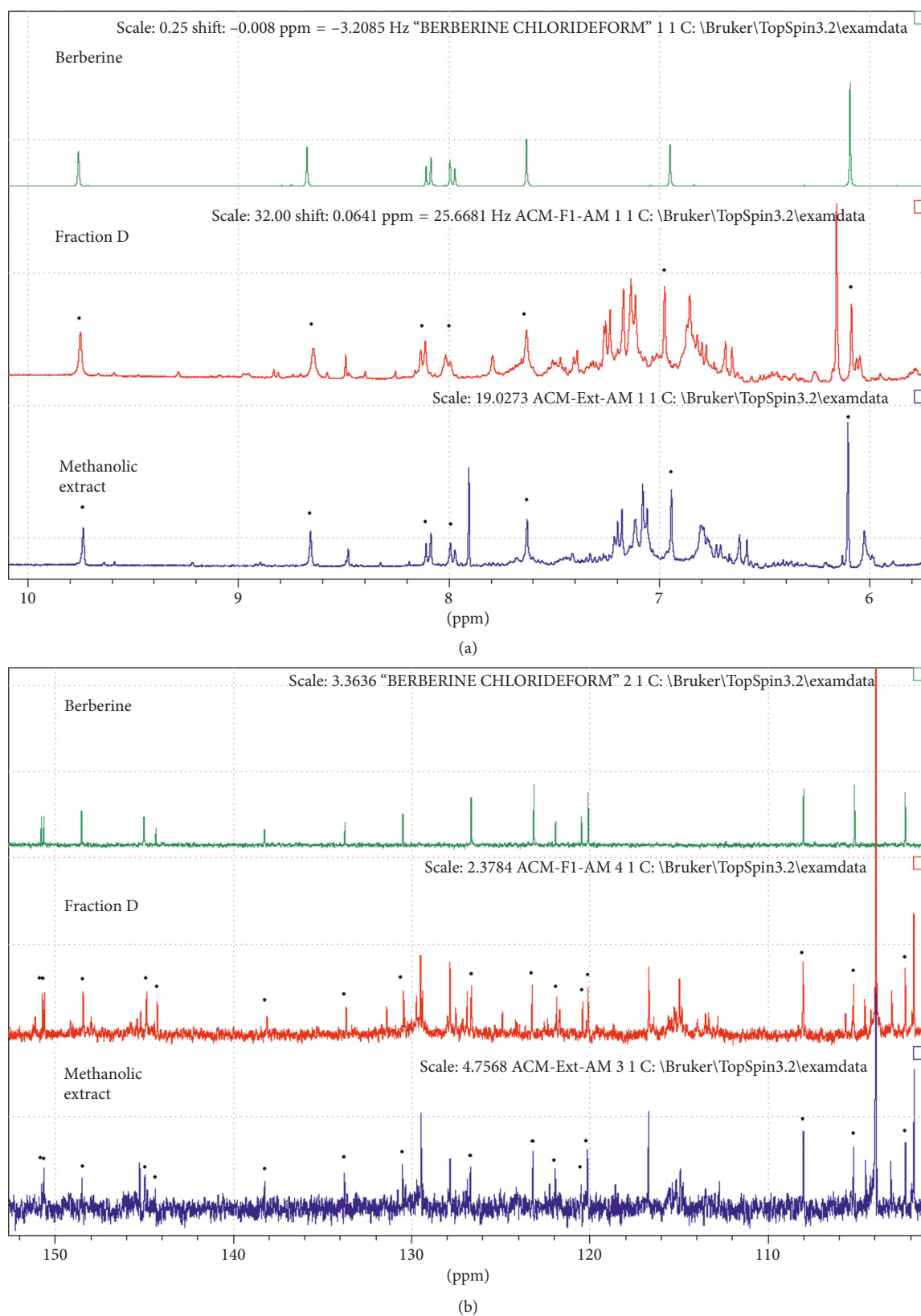


FIGURE 4: Comparison of (a) ^1H -NMR and (b) ^{13}C -NMR spectra of berberine, fraction D, and raw methanolic extract.

and *A. mexicana* [31]. It has been reported to have an anti-inflammatory effect and may improve blood flow and mitotic activity in traumatized rat livers [32]. In addition, its antimicrobial and antifungal activities have been reported [17]. The activity of this alkaloid was also reported in vitro against *P. falciparum*, *Leishmania donovani*, and *Trypanosoma brucei rhodesiense* [32]. Therefore, the results obtained in this work validate the use of this plant as an antiamoebic agent. This study also contributes to the search for new sources for the development of promising natural antiparasitic agents with possible applications in the pharmaceutical industry. More studies are being done to identify the synergy between the extract of the plant and standard antibiotics.

4. Conclusions

The methanolic extract of the leaves of *A. mexicana* showed growth inhibition activity against trophozoites of the *E. histolytica* strain HM1:IMSS under axenic conditions in vitro. The analysis of the fractions of this extract by HPLC-MS showed greater amoebicidal activity, thus indicating the presence of berberine alkaloids and jatrorrhizine.

Data Availability

All the data supporting the findings of this study are available within the article. Nevertheless, interested researchers requiring further information can obtain them from the corresponding author upon reasonable request.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors thank the financial support of the National Council of Science and Technology (CONACYT) through Project CB176853 and the subsidy received for Joel H. Elizondo Luevano (Registration no. 418935). The authors also thank M. C. Sergio García and Dr. Roberto Mercado for their invaluable technical assistance.

References

- [1] E. Pineda and D. Perdomo, "Entamoeba histolytica under oxidative stress: what countermeasure mechanisms are in place?," *Cells*, vol. 6, no. 4, p. 44, 2017.
- [2] A. H. Mokdad, M. H. Forouzanfar, F. Daoud et al., "Health in times of uncertainty in the Eastern Mediterranean Region, 1990–2013: a systematic analysis for the global burden of disease study 2013," *The Lancet Global Health*, vol. 4, no. 10, pp. e704–e713, 2016.
- [3] FAO/WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, "Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites," in *Microbiological Risk Assessment Series*, WHO, Geneva, Switzerland, 2014, <http://www.fao.org/3/a-i3649e.pdf%5Cfiles/540/a-i3649e.pdf>.
- [4] C. W. Xiao, Q. A. Ji, Q. Wei, Y. Liu, and G. L. Bao, "Antifungal activity of berberine hydrochloride and palmatine hydrochloride against microsporidium canis-induced dermatitis in rabbits and underlying mechanism," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 15, no. 1, pp. 1–15, 2015.
- [5] T. Meri, T. S. Jokiranta, L. Suhonen, and S. Meri, "Resistance of trichomonas vaginalis to metronidazole: report of the first three cases from Finland and optimization of in vitro susceptibility testing under various oxygen concentrations," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 38, no. 2, pp. 763–767, 2000.
- [6] F. M. M. Amaral, M. N. S. Ribeiro, J. M. Barbosa-Filho, A. S. Reis, F. R. F. Nascimento, and R. O. Macedo, "Plants and chemical constituents with giardicidal activity," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 16, pp. 696–720, 2006.
- [7] B. D. Mata-Cárdenas, J. Vargas-Villarreal, F. González-Salazar, R. Palacios-Corona, and S. Said-Fernández, "A new vial micro-assay to screen antiprotozoal drugs," *Pharmacologyonline*, vol. 1, pp. 529–537, 2008.
- [8] I. Bhattacharjee, S. K. Chatterjee, and G. Chandra, "Isolation and identification of antibacterial components in seed extracts of *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae)," *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, vol. 3, no. 7, pp. 547–551, 2010.
- [9] C. Simoes-pires, K. Hostettmann, A. Haouala et al., "International journal for parasitology: drugs and drug resistance reverse pharmacology for developing an anti-malarial phyto-medicine. The example of *Argemone mexicana*," *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, vol. 4, no. 3, pp. 338–346, 2014.
- [10] Y. C. Chang, F. R. Chang, A. T. Khalil, P. W. Hsieh, and Y. C. Wu, "Cytotoxic benzophenanthridine and benzyloisoquinoline alkaloids from *Argemone mexicana*," *Zeitschrift für Naturforschung C*, vol. 58, no. 7-8, pp. 521–526, 2003.
- [11] J. F. Xool-Tamayo, M. Monforte-González, J. Rubio-Piña, G. Mirón-López, and F. Vázquez-Flota, "Phytochemistry letters early developmental onset of alkaloid biosynthesis in Mexican poppy (*Argemone Mexicana* L) Papaveraceae," *Phytochemistry Letters*, vol. 20, pp. 300–305, 2017.
- [12] G. A. Magos-Guerrero, J. Santiago-Mejía, and O. F. Carrasco, "Exploratory studies of some Mexican medicinal plants: cardiovascular effects in rats with and without hypertension," *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, vol. 6, no. 3, pp. 274–279, 2017.
- [13] B. Sharma, S. Malhotra, V. Bhatia, and M. Rathee, "Epidemic dropsy in India," *Postgraduate Medical Journal*, vol. 75, no. 889, pp. 657–661, 1999.
- [14] G. Pouessel, C. Claverie, J. Labreuche et al., "Abstracts from the food allergy and anaphylaxis meeting 2016," *Clinical and Translational Allergy*, vol. 7, no. S1, p. 10, 2017.
- [15] G. Brahmachari, D. Gorai, and R. Roy, "Argemone mexicana: chemical and pharmacological aspects," *Revista Brasileira de Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 23, no. 3, pp. 559–575, 2013.
- [16] M. A. Saleh, F. H. A. Rahman, N. A. Ibrahim, and N. M. Taha, "Isolation and structure determination of new nematocidal triglyceride from *Argemone mexicana*," *Journal of Chemical Ecology*, vol. 13, no. 6, pp. 1361–1370, 1987.
- [17] G. Jasso Díaz, G. T. Hernández, A. Zamilpa et al., "In vitro assessment of *Argemone mexicana*, *Taraxacum officinale*, *Ruta chalepensis* and *Tagetes filifolia* against *Haemonchus contortus* nematode eggs and infective (L3) larvae," *Microbial Pathogenesis*, vol. 109, pp. 162–168, 2017.
- [18] A. Debnath, M. Ndao, and S. L. Reed, "Reprofiled drug targets ancient protozoans: drug discovery for parasitic diarrheal diseases," *Gut Microbes*, vol. 4, no. 1, pp. 66–71, 2013.

- [19] R. A. Pérez Hernández, C. L. Rivas, A. Oranday Cárdenas, C. E. Hernández Luna, E. Sánchez García, and C. Rivas Morales, "Efecto in vitro en la inhibición del proceso de nucleación en litiasis renal, capacidad de captura de radicales libres, actividad antimicrobiana y tóxica del extracto metanólico de *Berberis trifoliata*," *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 46, no. 1, pp. 70–76, 2015.
- [20] F. Ntie-Kang, P. A. Onguéné, L. L. Lifongo, J. C. Ndom, W. Sippl, and L. M. Mbaze, "The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants, part II: a pharmacological evaluation of non-alkaloids and non-terpenoids," *Malaria Journal*, vol. 13, no. 1, p. 81, 2014.
- [21] F. Calzada, J. C. Basurto, E. Barbosa et al., "Antiprotozoal activities of tiliroside and other compounds from *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don," *Pharmacognosy Research*, vol. 9, no. 2, pp. 133–137, 2017.
- [22] M. H. Zwietering, I. Jongenburger, F. M. Rombouts, and K. van't Riet, "Modeling of the bacterial growth curve," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 56, no. 6, pp. 1875–1881, 1990.
- [23] V. C. Mbatchou, D. P. Tchouassi, R. A. Dickson et al., "Mosquito larvicidal activity of *Cassia tora* seed extract and its key anthraquinones aurantio-obtusin and obtusin," *Parasites and Vectors*, vol. 10, p. 562, 2017.
- [24] E. A. Ashley and A. P. Phyto, "Drugs in development for malaria," *Drugs*, vol. 78, no. 9, pp. 861–879, 2018.
- [25] J. Rubio-Pina and F. Vazquez-Flota, "Pharmaceutical applications of the benzyloquinoline alkaloids from *Argemone mexicana* L.," *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 13, no. 17, pp. 2200–2207, 2013.
- [26] Y. Li, H. Wang, N. Si et al., "Metabolic profiling analysis of berberine, palmatine, jatrorrhizine, coptisine and epi-berberine in zebrafish by ultra-high performance liquid chromatography coupled with LTQ Orbitrap mass spectrometer," *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, vol. 45, no. 4, pp. 302–311, 2015.
- [27] P. R. Vuddanda, S. Chakraborty, and S. Singh, "Berberine: a potential phytochemical with multispectrum therapeutic activities," *Expert Opinion on Investigational Drugs*, vol. 19, no. 10, pp. 1297–1307, 2010.
- [28] Y. Kaneda, T. Tanaka, and T. Saw, "Effects of berberine, a plant alkaloid, on the growth of anaerobic protozoa in axenic culture," *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*, vol. 15, no. 6, pp. 417–423, 1990.
- [29] S. Singh, T. Singh, V. P. Singh, and V. B. Pandey, "A new benzyloquinoline alkaloid from *Argemone mexicana*," *Natural Product Research*, vol. 24, no. 1, pp. 63–67, 2010.
- [30] H. Mahmoudvand, S. A. Ayatollahi Mousavi, A. Sepahvand et al., "Antifungal, antileishmanial, and cytotoxicity activities of various extracts of *Berberis vulgaris* (Berberidaceae) and its active principle berberine," *ISRN Pharmacology*, vol. 2014, Article ID 602436, 6 pages, 2014.
- [31] H. M. Malebo, T. Wenzler, M. Cal et al., "Anti-protozoal activity of aporphine and protoberberine alkaloids from *Annickia kummeriae* (Engl. & Diels) Setten & Maas (Annonaceae)," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 13, no. 1, p. 48, 2013.
- [32] Y. Yu, Z.-b. Yi, and Y.-Z. Liang, "Main antimicrobial components of *Tinospora capillipes*, and their mode of action against *Staphylococcus aureus*," *FEBS Letters*, vol. 581, no. 22, pp. 4179–4183, 2007.





In Vitro Effect of Methanolic Extract of *Argemone mexicana* against *Trichomonas vaginalis*

Joel Horacio Elizondo-Luevano¹, Julia Verde-Star¹, Azucena González-Horta¹, Rocío Castro-Ríos²,
Magda Elizabeth Hernández-García^{3,*}, Abelardo Chávez-Montes^{1,*}

¹Department of Chemistry, College of Biological Sciences, Autonomous University of Nuevo León, Nuevo León 66455, México; ²Department of Analytic Chemistry, College of Medicine, Autonomous University of Nuevo León, Nuevo León 64460, México; ³Northeast Biomedical Research Center, Instituto Mexicano del Seguro Social, Nuevo León 64720, México

Abstract: Infections caused by *Trichomonas vaginalis* in humans are one of the main public health problems caused by sexually transmitted diseases. Objective of this study was to evaluate potential biological activity of the medicinal plant *Argemone mexicana* (Mexican poppy) on *T. vaginalis*. Methanolic extracts of the stems and leaves of *A. mexicana*, and different fractions were prepared with solvents of different polarities. The extracts and functional groups were detected containing sterols, triterpenes, quinones, flavonoids and, alkaloids. Extracts from both the stems and leaves of *A. mexicana* inhibited the growth of *T. vaginalis* with half-maximal inhibitory concentration value of 70.6 and 67.2 µg/ml, respectively. In the active fractions, the most abundant compounds were berberine and jatrorrhizine, with presumed antiparasitic activity.

Key words: *Argemone mexicana*, *Trichomonas vaginalis*, trichomoniasis, alkaloids

INTRODUCTION

Trichomoniasis is a sexually transmitted disease caused by the flagellated protozoan *Trichomonas vaginalis* (Donné, 1836) that is more frequent than gonorrhea, syphilis or chlamydia; furthermore, it is considered the most common nonviral sexually transmitted disease in the world, the highest incidence occurs in women between 16 and 35 years of age, and the overall prevalence has been estimated at 8.1% for women and 1.0% for men [1]. Due to the increased prevalence of this disease and the emergence of strains resistant to the drug of choice, metronidazole, the search for alternative active principles is essential for the effective control of this disease [2]. The World Health Organization estimated that there were 276.4 million cases of trichomoniasis in 2013, and 90% of these infections occurred among people living under precarious conditions with limited resources [3].

Natural products, especially plants, are an important source of metabolites with diverse biological properties that can be

used as active principles for the treatment of diseases, and the therapeutic use of medicinal plants is the fundamental basis for the discovery and development of new active principles, as such plants contain metabolites with diverse biological properties [4]. Popular knowledge of medicinal plant use is a powerful tool in the search for new active principles and, the WHO estimates that between 65% and 80% of the population in developing countries depends on traditional medicine [5]. In Mexico, plants are an abundant and accessible resource, and their use in traditional medicine dates back to the pre-hispanic era [6].

Argemone mexicana (Mexican poppy) is a plant that is widely distributed in many tropical and subtropical countries, and it is commonly found on the edges of roads or in vacant lots, this plant, also known as Mexican poppy, is an annual erect thorny herb of approximately 1 m in height with broad leaves at the base (usually measuring 5 to 11 cm long) with green and white spots on their surfaces, and the stem is prominently lobed-sinuous and thorny [7]. The presence of various types of chemical constituents has been reported in this plant, with alkaloids being the most abundant [8]. In traditional medicine, different parts of this plant are used to treat chronic skin diseases and the flowers have expectorant properties and have been used in the treatment of cough [9]. The seeds have a laxative effect, and the latex is used against conjunctivitis, the seed

•Received 9 October 2019, revised 9 March 2020, accepted 13 March 2020.

*Corresponding authors

(abelardo.chavezmn@uanl.edu.mx; magda.hernandez@imss.gob.mx)

© 2020, Korean Society for Parasitology and Tropical Medicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

oil is used as a remedy for asthma, ulcers, dysentery and other intestinal conditions [10,11]. Furthermore, various parts of *A. mexicana* plants have been shown to have activity against malaria, leishmaniasis, and trypanosomiasis diseases caused by *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, and *Trypanosoma brucei rhodesiense*, respectively [12-14].

Given the above background information and the traditional use of *A. mexicana* as a medicinal plant, the main objective of this study was to evaluate the potential biological activity of *A. mexicana* against the viability of *T. vaginalis*. Specifically, the activities of methanolic extracts from *A. mexicana* stems and leaves, as well as their fractions, were evaluated against *T. vaginalis*.

MATERIALS AND METHODS

Plant and microbiological material

The stems and leaves of *A. mexicana* were collected in February 2018 in the city of San Nicolás de los Garza [25°44'15.3"N 100°19'00.3"W] in the state of Nuevo León, Mexico. The plant was taxonomically identified at the Laboratory of Botany, College of Biological Sciences, Autonomous University of Nuevo León, under registration number 029128. *T. vaginalis* strain GT15 IMSS:0989 was provided by the Northeast Biomedical Research Center of the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Extraction

To obtain the methanolic extracts of *A. mexicana*, the stems and leaves were dried at room temperature and subjected to extraction via maceration. A 100 g portion was ground into a fine powder that was then used for successive extractions (5 × 250 ml) with absolute methanol (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, USA) at room temperature in an amber flask on an orbital shaker (LAB-LINE, 3508, LAB-LINE Instruments, Inc. Melrose Park, Illinois, USA) with stirring (100 rpm) and solvent replacement every 24 hr. The extract was filtered through Whatman filter paper No. 1 and concentrated under reduced pressure at 45°C with the aid of a rotary evaporator (Heidolph® Rotary Evaporator, Laborota 4010). The residual solvent was evaporated at room temperature, and the obtained solid extracts were weighed to calculate the percent yield. The extracts were referred to as the AmexS (stem) and AmexL (leaf) extracts, and they were stored in the dark at 4°C until subsequent use. To fractionate the AmexS and AmexL extracts, the solid extract was serially partitioned using solvents of different

polarities. The total crude solid extract was dissolved in 100 ml of hexane via magnetic stirring for 10 min at 25°C. The solution was filtered through Whatman No. 1 paper, and the obtained solid residue was subjected to the same treatment with an additional 50 ml portion of hexane. The two hexane solutions were then mixed (fraction 1). The residue was extracted with three 50 ml portions of CHCl₃ (fraction 2), which were then also filtered through Whatman paper, and the solid residue was extracted with absolute MeOH (4 × 50 ml) and filtered through Whatman No. 1 (fraction 3). Next, 100 ml of methanol was added to the resulting insoluble solid, and the mixture was heated (60°C) for 5 min with stirring and then filtered (fraction 4). Last, the remaining solid was solubilized in 30 ml of distilled water (fraction 5). The solution was filtered, frozen at -20°C and lyophilized at -50°C and 0.2 mBar (FreeZone 2.5 Liter Benchtop Freeze Dryer, LABCONCO, Missouri, USA). This procedure was applied to stems and leaves separately, and all of the solvents were analytical grade. The following equation was used to calculate the yield for each extraction (WE = weight of the extract obtained and WI = initial weight of the plant material):

$$\text{Yield } \left(\% \frac{w}{w} \right) = \frac{WE}{WI} \times 100$$

Phytochemical analysis

Various selective qualitative techniques were used for the basic phytochemical analysis of the extracts: 2,4-dinitrophenylhydrazine (carbonyl groups), anthrone (carbohydrates), Baljet (sesquiterpene lactones and coumarins), sodium bicarbonate (carboxyl groups), ferric chloride (phenols and tannins), Dragendorff (alkaloids), Liebermann-Burchard (sterols and triterpenes), potassium permanganate (double bonds), Shinoda (flavonoids), sodium hydroxide (coumarins), Bornträger (quinones) and the saponins test [15].

Growth kinetics of *T. vaginalis*

Growth curves were generated in triplicate by recording the growth for 120 hr after inoculation of 100,000 *T. vaginalis* GT15 trophozoites into 5 ml of TYI-S-33 medium supplemented with 10% bovine serum in 13 × 100 mm screw-cap tubes. The trophozoites were incubated at 37°C for 120 hr, and the number of trophozoites was determined every 24 hr and their growth parameters in the medium were evaluated. Linear regression was used to obtain the growth parameters, generation time and protozoan doubling time. The generation time

was determined via the following equation:

$$G = \frac{t}{3.3} \log \frac{b}{B}$$

G=generation time, t=time interval of the exponential phase, B=number of organisms at the beginning of the time interval, b=number of organisms at the end of the time interval. To determine the doubling time (dt), the following equation was used: dt=0.693 G.

Activity of the extracts against *T. vaginalis*

The activity of the methanolic extracts against *T. vaginalis* was evaluated using a microassay technique [16]. In an amber bottle, a concentrated solution of the crude methanolic extract (1 mg/ml) was prepared in 5% w/v dimethylsulfoxide (DMSO). This solution was sterilized by passing it through a 0.2 µm pore size nylon membrane filter (Merck Millipore, KGaA, Darmstadt, Germany), and it was stored at 4°C until use. Serial dilutions were produced by adding 500 µl of sterile deionized water to 500 µl of the concentrated solution. The concentrations of the working solutions were 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, and 1,000 µg/mL. 1×10^5 *T. vaginalis* in logarithmic phase were inoculated into 1 ml aliquots of TYI-S-33 medium in culture tubes (Bellco Biotechnology, BellcoGlass Inc., Vineland, New Jersey, USA), and 50 µl of the working solutions was added to each tube. The tubes were then incubated at 37°C for 24 hr. Metronidazole (0.1 µg/ml) was used as a positive control, 5% DMSO was used as a negative control and TYI-S-33 culture medium is used as a blank control [17]. After the incubation period, the tubes containing the treated cultures were cooled to 4°C in ice water for 20 min, and the number of trophozoites per ml in each tube was counted with a hemocytometer (Neubauer, Hausser Scientific, Horsham, Pennsylvania, USA). For counting, a 1:10 dilution in formalin was first performed to fix the trophozoites. The results were expressed as the percentage of growth inhibition in the treated cultures compared to those of the untreated controls. The half-maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) were determined via the Probit statistical test. All assays were performed in triplicate.

Analysis via liquid chromatography and mass spectrometry

The AmexS and AmexL crude extracts, as well as the active fractions were analyzed via a high-performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD). Briefly, 15 mg units of the dry fractions were dissolved in a 1 ml methanol

mixture and then filtered through a 0.2 mm pore size nylon membrane (Millipore Millex®). For the analysis, an Alliance 2695 liquid chromatograph (Waters) equipped with an in-line degasser, quaternary pump, autosampler, column temperature control module and, diode array detector was used. The separation was carried out in a Kinetex PFP column (50 × 2.1 mm; Phenomenex, Torrance, California, USA) with a mixture of an aqueous solution of formic acid (1%) and methanol as the mobile phase. The gradient program started with 30% methanol, which was maintained for 2 min, followed by a linear increase to 100% over 5 min. This concentration was maintained for 1 min and then returned to the initial conditions over 2 min. The reconditioning time between analyses was 10 min. The mobile phase flow rate was 400 µl/min, the column was maintained at 50°C and the injection volume was 0.5 µl. To confirm the identities of the components identified in the active fractions, mass spectrometry analysis was performed via direct infusion using an LCQ Fleet (Thermo Scientific) mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source and an ion trap analyzer. In the ionization source, nitrogen was used as the sheath gas at a flow rate of 30 units. Working in positive mode, the voltage of the electrospray capillary was set to 5 kV and the voltage of the desolvation capillary set to 43 V at 275°C. The lens tube voltage was maintained at 75 V. Data acquisition was performed in full-scan mode over a mass-to-charge ratio (m/z) range of 100 to 1,000. In mass/mass experiments for the most intense ions, the collision-induced dissociation (CID) mode was used, and the normalized collision energy was adjusted to obtain adequate fragmentation with an insulation width of 1 m/z, an activation Q of 0.3 and an activation time of 30 ms.

Cytotoxicity assessment for methanolic extract by hemolysis test

Cytotoxicity was evaluated by monitoring the hemolysis of an erythrocyte suspension. Human blood was obtained from healthy donors, and the blood was mixed with EDTA (1.5 mg/ml of blood) and separated via centrifugation at 1,000 rpm for 5 min at 37°C. The cell pellet was washed four times with phosphate-buffered solution (PBS pH 7.4, 10 mM) and the supernatants were discarded. The erythrocytes were subsequently used to prepare a red blood cell suspension for 5% v/v assays in PBS. To evaluate the cytotoxicity of the extracts against the erythrocytes, aliquots of the previously prepared red blood cell suspension were incubated with different concentrations of the extracts for 30 min at 37°C protected from

light. A solution of untreated erythrocytes (Abs Ctrl-) was used as a negative control. For the positive control, sterile distilled water was added to untreated erythrocytes to induce osmotic hemolysis (Abs Ctrl+) [18]. After incubation, spectrophotometric readings were taken at 540 nm, the maximum absorption wavelength of the hemoglobin released in the supernatant, using a microplate reader (EPOCH™ Microplate Spectrophotometer; BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA). The readings were recorded as the absorbance of the treated samples at each concentration given in parts per million (Abs Tx) [19]. These values were used to calculate the percentage of hemolysis using the following Equation:

$$\% \text{ Hemolysis} = \left[\frac{(\text{Abs Tx}) - (\text{Abs Ctrl-})}{(\text{Abs Ctrl+}) - (\text{Abs Ctrl-})} \right] \times 100$$

Statistical analysis

One-way analysis of variance (One-way ANOVA) was used to evaluate the performance of the extracts at different concentrations, and the Tukey test (Post-Hoc) was used for multiple comparison of means ($P \leq 0.05$). In addition, the Probit test was used to determine the concentration required for 50% growth inhibition (IC_{50}) with a confidence interval of 95% using SPSS version 24.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois, USA). All assays were performed in triplicate.

RESULTS

Compounds in extract fractions

The present study evaluated the trichomonocidal activity of the methanolic extracts of *A. mexicana* stems and leaves, the fractions of these extracts obtained via partitioning with solvents of different polarities. The yields of the maceration-based extractions were 10.0% and 12.7% for the dry stems and leaves, respectively. The results of the basic phytochemical analysis of the crude extracts are presented in Table 1. Unsaturates, quinones, sterols, triterpenes, saponins, flavonoids, carbohydrates, and alkaloids were detected in both the AmexS and AmexL extracts. The results suggest that, the plant showed both presence and absence of various compounds. Then, the crude extracts were analyzed via HPLC-DAD. As shown in Fig. 1A, B, they presented similar chromatographic profiles. In both extracts, signals with retention times and absorption spectra were very similar to that of the alkaloid berberine (Fig. 1C).

Table 1. Phytochemical analysis on crude extracts of *Argemone mexicana* stems and leaves

Chemical test	AmexS	AmexL
Unsaturates	+++	+
Carbonyl groups	-	-
Coumarins	-	-
Sesquiterpene lactones	-	-
Quinones	+	++
Triterpenes - sterols	+	+
Carboxyl group	-	-
Phenolic groups	+	++
Saponins	+	+
Flavonoids	+	++
Carbohydrates	+++	+
Alkaloids	+++	+++

The preliminary phytochemicals were analyzed in order to detect presence or absence of some important phyto-compounds. The results in the phytochemical tests are presented as negative - or presence +, high presence ++ and very high presence +++. The plant showed both presence and absence of various compounds.

Growth kinetics of *T. vaginalis*

To evaluate the activity of the extract, it was necessary to first determine the time required for the *T. vaginalis* cultures to reach the logarithmic growth phase, that is, the optimum growth point that indicates the greatest number of trophozoites. To this end, a growth kinetics analysis was performed (Fig. 2). We observe that *T. vaginalis* have a generation time of 5.8 hr and a doubling time of 4.0 hr, so its exponential phase is at 48 hr. With these results we establish the incubation time parameters for the parasite before starting with the biological tests.

Activity of extracts against *T. vaginalis*

Table 2 shows the results obtained from in vitro assays of the activities of the methanolic crude extracts of the stems (AmexS) and leaves (AmexL) against *T. vaginalis* growth. Both extracts could inhibit trophozoite growth, and there was a clear dose-response relationship as the percentage of inhibition decreased with decreasing extract concentration. For both AmexS and AmexL, total inhibition was achieved at a concentration of 1,000 µg/ml, and at 500 µg/ml, the inhibition shown by both extracts was greater than 97%; furthermore, as the doses decreased, the viability increased. The positive control (0.124 µg/ml metronidazole) showed 100% inhibition, while the negative control and the Blank control showed almost no inhibition (2.0% and 1.0%, respectively). The activities of the AmexS and AmexL extracts were compared via ANOVA ($P > 0.05$). The Tukey test was used for multiple com-

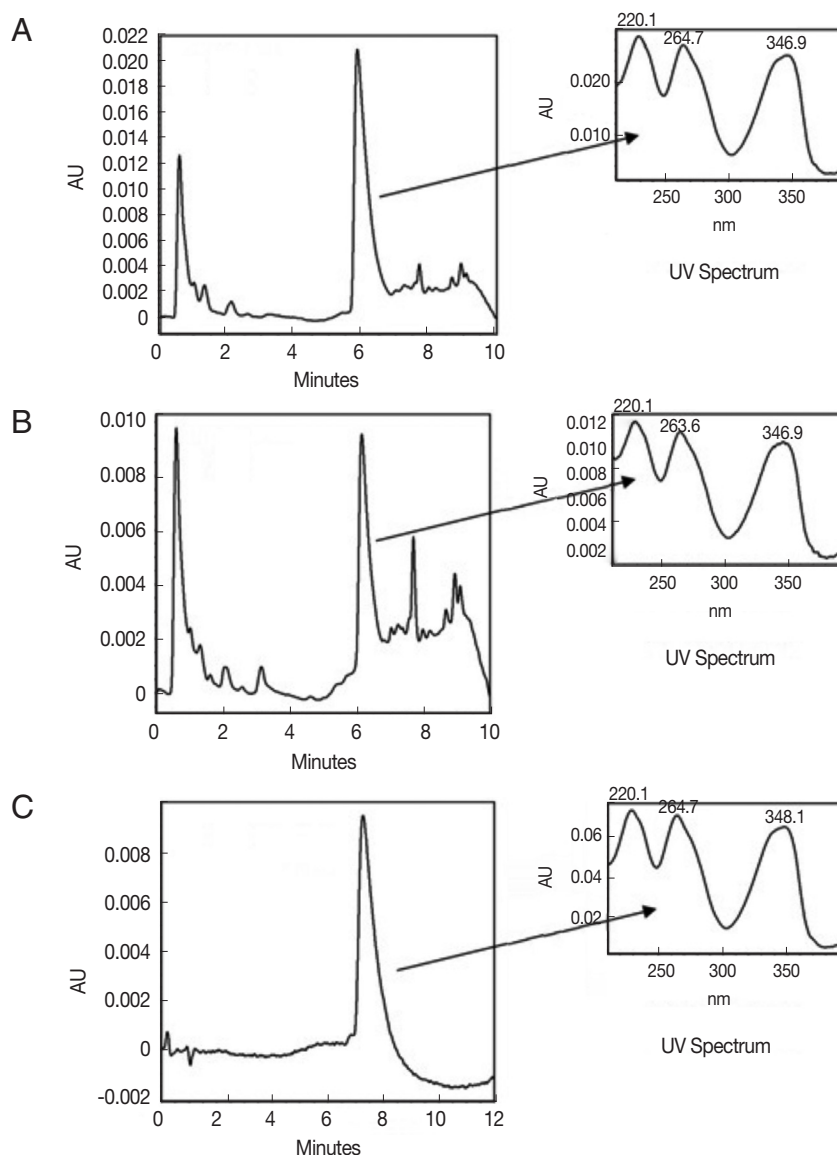


Fig. 1. HPLC-DAD chromatograms for AmexS (A), AmexL (B) crude extracts and berberine (C) solutions (15 mg/ml).

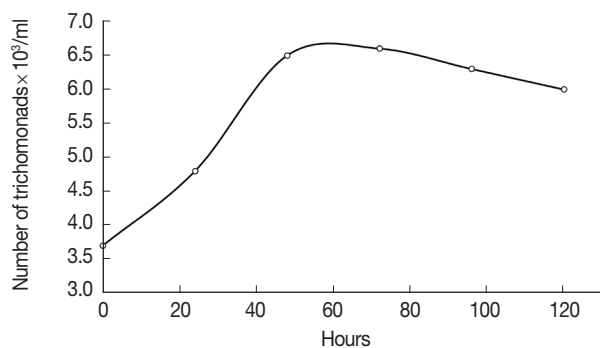


Fig. 2. Growth kinetics of *Trichomonas vaginalis* in TYI-S-33 medium. Each point is mean of 3 independent counts.

parison of the means of the inhibitory effects of the AmexS and AmexL extracts (Table 2).

Inhibitory concentrations

The IC_{50} values of the extracts against *T. vaginalis*, estimated via the Probit method, are shown in Table 3. The IC_{50} values of both the AmexS and AmexL extracts were less than 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The IC_{50} determination against *T. vaginalis* showed that the stem and leaf methanolic extracts had an IC_{50} of 70.8 and 67.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively, an IC_{50} analysis was also performed for the first-choice drug (metronidazole), and for the metabolite most

Table 2. Percentage of inhibition of *Trichomonas vaginalis* growth

Extract	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)						
	15.63	31.25	62.5	125	250	500	1,000
AmexS	14.7 \pm 1.2	25.3 \pm 1.2	38.7 \pm 0.4	64.4 \pm 0.6	83.4 \pm 2.0	97.4 \pm 0.1	100.0 \pm 0.0
AmexL	18.0 \pm 1.1	29.6 \pm 1.6	40.4 \pm 0.8	70.1 \pm 0.3	84.2 \pm 1.9	98.1 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0

Evaluation of *T. vaginalis* viability in the presence of different extract concentrations. The values are shown as the mean of the percent inhibition \pm SD. Means followed by the same letter are not significantly different based on the Tukey test for multiple comparisons of means ($P < 0.05$). All assays were performed in triplicate.

Table 3. Mean half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) against *Trichomonas vaginalis* determined by the Probit test

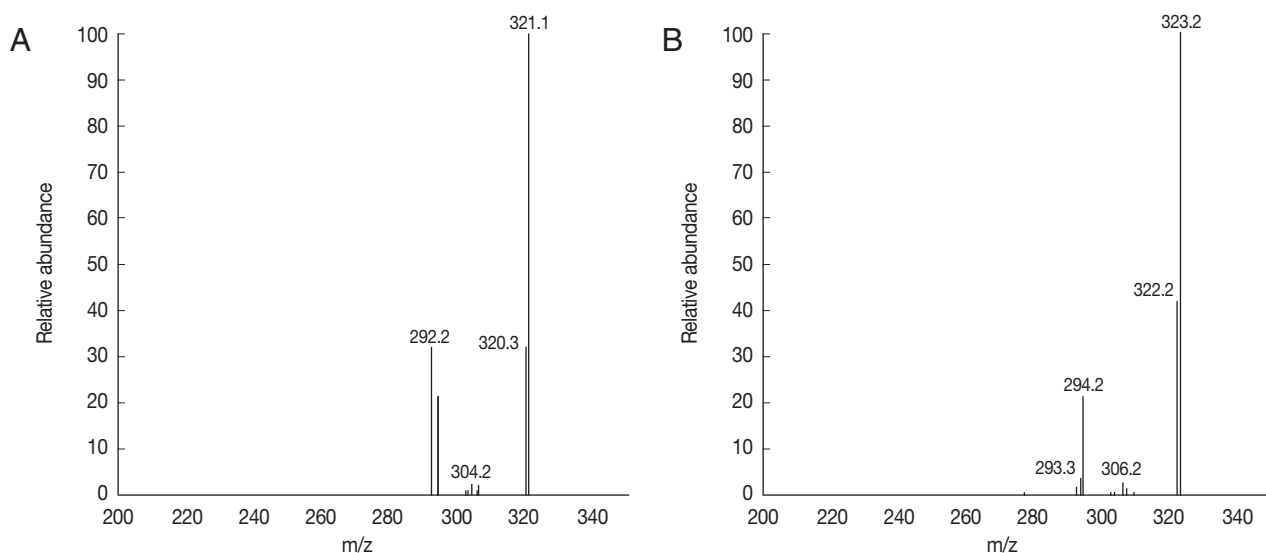
Treatment	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
AmexS	70.8 (63.6-86.2)
AmexL	67.2 (61.9-74.7)
Berberine	40.7 (35.5-47.8)
Metronidazole	0.1 (0.1-0.2)

The values are shown as the mean \pm SD. Confidence interval 95%. Berberine: Main metabolite of *A. mexicana*. Metronidazole: Reference drug for the treatment of *T. vaginalis*. All assays were performed in triplicate.

Table 4. Lethality percentage of fractions of the AmexS and AmexL extracts against *Trichomonas vaginalis* at 125 $\mu\text{g/ml}$

Fraction	AmexS	AmexL
1	ND	50.4 \pm 1.9
2	51.1 \pm 0.5	53.2 \pm 2.0
3	73.0 \pm 0.1	79.2 \pm 0.2
4	ND	55.2 \pm 0.3
5	ND	ND

Data expressed as % lethality. ND: not determined because it did not reach 50% inhibition. The values are expressed as the mean \pm SD ($P < 0.05$). All assays were performed in triplicate.

**Fig. 3.** Direct infusion-electrospray ionization-ion-trap MS2 full scan product. Ion mass spectra of $[M]^+$ ions of (A) berberine (m/z 336) and (B) jatrorrhizine (m/z 338) obtained from the AmexL3 fraction.

widely reported in this plant (berberine), metronidazole showed an IC_{50} of 0.1 $\mu\text{g/ml}$ and berberine of 40.7 $\mu\text{g/ml}$. IC_{50} was determined with total crude extract without fractionation and it can be seen that berberine presented a better result than raw extracts. Once the trichomonacidal activities of the extracts were determined, the extracts were partially purified via fractionation based on their solubility in 5 solvents with various polarities. These fractions were numbered, and their lethality

against *T. vaginalis* was evaluated at a concentration of 125 $\mu\text{g/ml}$. The most efficient fractions from both the AmexS and AmexL extracts were the methanolic partitions, which showed lethality percentages of 73.0% and 79.2%, respectively. Therefore, of all the fractions, AmexL3 was classified as an active fraction (Table 4).

To characterize the active fraction (AmexL3), it was analyzed by tandem mass spectrometry (MS/MS). Among the signals

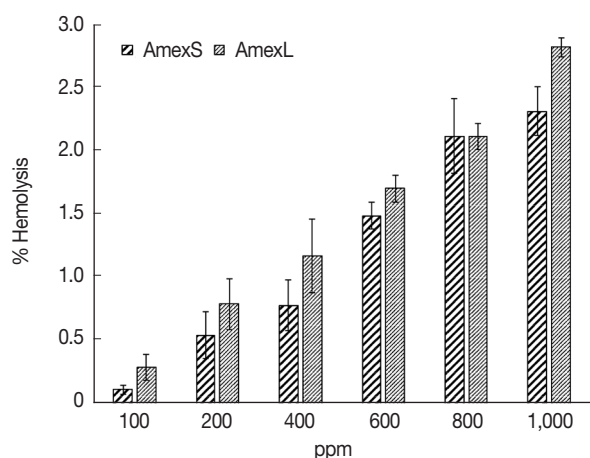


Fig. 4. Hemolytic cytotoxicity of AmexS and AmexL extracts. The results in the columns are shown as the percentage of hemolysis. Values are shown as mean \pm SD. All assays were performed in triplicate.

with the highest intensities, the ions at m/z 336 and 338 were attributed to berberine (Fig. 3A) and jatrorrhizine (Fig. 3B). All the data for compounds were consistent with the reported values for berberine and jatrorrhizine.

Least cytotoxicity of the crude extracts

Considering the potential use of the extracts, it was decided to evaluate the cytotoxicity of the crude *A. mexicana* stem and leaf extracts via a human erythrocyte hemolysis test. It was observed that none of the extracts were significantly cytotoxic, as even at the highest concentration tested (1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$). It was found that the stem and leaf extracts resulted in hemolysis of 2.3% and 2.8% RBCs, respectively. At the lowest concentrations (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), the percentages erythrocyte hemolysis of the stem and leaf extracts were 0.1% and 0.3%, respectively (Fig. 4). The negative control did not show detectable hemolysis, and the positive control (distilled water) showed 100% hemolysis.

DISCUSSION

In the present investigation, extracts of *A. mexicana* L. (Papaveraceae) stems and leaves and their fractions obtained by partitioning with solvents of different polarities were evaluated for determination of their activity against *T. vaginalis*. Extractions were carried out by maceration with methanol, the percentages of crude extract yield are similar to a previous study that worked with extract of the entire plant, which obtained a yield of 10.7% [20]. The results of the basic phytochemical

analysis (Table 1) are consistent with those of a previous study that alkaloids were the predominant compounds [5]. Terpenoids, flavonoids, alkaloids, terpenes, long-chain aliphatic compounds and a few aromatics are also detected as constituents of this plant. It should be noted that the chemical composition of the plant may differ depending on which parts analyzed, the harvesting time and the geographical area [21].

The crude extracts were analyzed by HPLC-DAD, their chromatographic profiles with signals, retention times and absorption spectra were very similar to that of the alkaloid berberine. These results are consistent with those of other studies that detected the presence of this alkaloid in the leaves of *A. mexicana* by analyses of methanolic extracts [13,22]. Also, previously performed phytochemical tests revealed the presence of several alkaloids in *A. mexicana* leaves, including berberine and jatrorrhizine, as well as protopine, alocriptopine and sanguinarine [10].

Growth kinetics analysis of *T. vaginalis* was performed. The doubling time of the parasite was 4.01 hr, while exponential growth phase, in which the parasite enters a period characterized by cell duplication and maximum metabolic activity, was reached after 24 hr, the maximum slope of the curve will be the specific growth rate of the organism in that particular environment, these culture characteristics are in line with the clinical characteristics and the progress of the natural infection [23]. The times obtained in this study are consistent with those previously reported previously for this same strain [16].

The activities of the AmexS and AmexL extracts were compared by one-way ANOVA, and no significant differences were found in their activities ($P > 0.05$). These results are consistent with the expectations that the chemical components present in both extracts are similar, since the secondary metabolites, such as berberinoids, to which antiparasitic activity has been attributed, are widely distributed in the plant. Subsequently, the percentages of inhibition against *T. vaginalis* in each of the concentrations evaluated of both extracts were compared, finding a significant difference in the AmexS ($F = 2,233.83$, $P < 0.001$) and AmexL ($F = 885.62$, $P < 0.001$) extracts. In order to compare the percentages of inhibition in each pair of concentrations in both extracts, the Tukey (PostHoc) test was applied. This analysis revealed a significant difference between the different concentrations tested, except in the highest concentrations (i.e. 500 and 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$), the results are shown in Table 2 (different letters show significant differences). These findings confirm that the concentrations had a dose-response

effect; these concentrations are relevant since the total raw extract is evaluated without fractionation or purification. In 2011, it was found that the aqueous extract of *A. mexicana* leaves exhibited significant anthelmintic activity against *Ascaridia galli* and *Pheretima posthuma* in a dose dependent manner at concentration of 100 mg/ml [13].

The IC_{50} values of both the AmexS and AmexL extracts, metronidazole and berberine, were determined. Antiparasitic activity of *A. mexicana* against different etiological agents has been demonstrated, as for example it has been found that it has effective activity against *P. falciparum* has also been demonstrated, as the aqueous extract of the aerial parts of this plant exhibited an IC_{50} of 5.9 μ g/ml [24]. Activity of the methanolic extract of *A. mexicana* leaves against *E. histolytica* trophozoites has been reported, and the results revealed a dose-dependent behavior with lethality percentages of 98.1% and 75.0% at concentrations of 500 μ g/ml and 125 μ g/ml, respectively [25]. At the moment there are no reports of the use of extracts of *A. mexicana* or its fractions against *T. vaginalis* and our results seem even more promising when sub-fractions of the extracts [26] or the majority metabolite are evaluated, as in our case that Berberine showed a greater inhibitory capacity (IC_{50} = 40.7 μ g/ml) compared to complete extracts analyzed by the Probit test, in which it can be seen that the upper and lower limits are overlapped between AmexS and AmexL, but not with berberine.

Once the trichomonocidal activities of the extracts were determined, the extracts were partially purified by fractionation based on their solubility in five solvents with various polarities. The most efficient fractions were the methanolic partition, AmexL3 classified as an active fraction. Partitioning of a crude extract with solvents of different polarities is common for the extraction of different components because it is possible to extract them and then purify and identify them via chromatographic and spectroscopic techniques. Metabolites derived from berberine with biological activity against the human colon cancer cell line SW480 were identified via extraction and purification from the methanolic *A. mexicana* extract, among which the chloroformic and methanolic fractions were noteworthy [22]. These berberine derivatives were also shown to have an effect against *Plasmodium berghei* in a murine model [27]. The present study is relevant because there are no reports of the use of *A. mexicana* extracts or their fractions against *T. vaginalis*, although studies have evaluated extracts (acetone, methanol, ethanol, and aqueous) of this plant or their frac-

tions for potential effects against many etiologic agents as bacteria, fungi, viruses, nematodes and parasites [13].

To characterize the active fraction (AmexL3), it was analyzed via mass spectrometry (Fig. 3). Fragmentation of the ion observed at 336 m/z, which corresponded to quaternary berberine ($[M]^+$), ions were observed at 321 m/z (M-CH₃), 320 m/z (M-CH₄), and at 304, 306, and 292 m/z (M-CH₄-CO). In turn, fragmentation of the ion observed at 338 m/z, which was attributed to quaternary jatrorrhizine ($[M]^+$), generated ions at 323 m/z (M-CH₃), 322 m/z (M-CH₄), 306 m/z (MH-CH₃O), and 294 m/z (M⁺H-3CH₃). These fragmentation patterns confirm the presence of berberine and jatrorrhizine [28-30].

The alkaloids found in the AmexL3 fraction are perhaps responsible for the biological activity, as their effectiveness has been attributed to their presence in plant extracts evaluated against the parasites *G. lamblia*, *E. histolytica*, and even *T. vaginalis* [31]. It has been reported that berberine has several pharmacological effects and activity against a variety of bacteria, fungi, protozoa, helminths and viruses; furthermore, it has been demonstrated that when berberine is mixed with other alkaloids, it has more robust activity against different microorganisms [20].

It has also been demonstrated that berberine sulfate exerts inhibitory effects against *G. lamblia*, *T. vaginalis* and *E. histolytica* in axenic cultures, in which it was observed that the trophozoites swelled. In addition, the presence of glycogen deposits and the appearance of irregularly shaped vacuoles in the cytoplasm were observed with morphological changes in parasites, including chromatin aggregation in the nucleus, formation of autophagic vacuoles and aggregations of small vacuoles in the cytoplasm were observed [32]. The presence of the jatrorrhizine alkaloid has been reported in plants such as *Enantia chlorantha* and *A. mexicana* and, its antimicrobial and antifungal activity has been explored [20]; and it has been shown to be effective against *P. falciparum*, *L. donovani*, and *T. b. rhodesiense* in vitro assays [12,14]. Li et al. [33] found that jatrorrhizine derivatives had much stronger antimicrobial effects compared with that of pure jatrorrhizine.

In this context, considering the potential use of the extracts, it was decided to evaluate the cytotoxicity of the crude *A. mexicana* stem and leaf extracts by a human erythrocyte hemolysis test. Hemolysis assays are usually used to test the toxicity of relatively low concentrations of extracts; for example, it was reported that the methanolic extract of *Nymphaea nouchali* leaves showed no hemolytic activity at concentrations from 40 to

100 µg/ml [19]. In the present study, it was decided to evaluate the toxicity at high concentrations, i.e., 1,000 µg/ml, and with total extracts (AmexS and AmexL) to test the full range of compounds present in the crude extracts. In a similar study [34], assays were performed with the hexane extract of *Bridelia ferruginea* leaves, and its hemolytic effect was evaluated at concentrations of 20 and 80 ng/ml, which resulted in 4.8% and 91.7% hemolysis, respectively. When comparing these results with those obtained in the present study, in which we tested concentrations up to 1,000 µg/ml, none of our extracts can be considered to be significantly toxic ($P \leq 0.05$ with approximately 2.5% hemolysis) based on the criteria of Karimi et al. [35]. These findings indicate that this toxicity could be related to the mechanical stress imparted by the stirring used in the method.

Considering the impact of trichomoniasis on public health and the increasing number of metronidazole resistant isolates, it is important to develop alternatives for treating this infection, new research indicates that when *T. vaginalis* adheres to normal epithelial cells, it causes inflammation, cytotoxicity, production of proinflammatory cytokines, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) [36]. Natural products are a promising source of active molecules, and the ethnopharmacological approach retrieves knowledge of medicinal plants held by the population. This ancestral wisdom, in combination with phytochemical and pharmacological studies, is highly valuable for the bioprospecting of safe and accessible medications [37].

This pioneering study showed relevant details of the activity of *A. mexicana*, a plant traditionally used by the Mexican indigenous population to treat infectious diseases. Methanolic extracts of *A. mexicana* stems and leaves showed inhibitory activity against *T. vaginalis* growth in vitro, with the leaf extract being the more effective. Neither extract showed hemolytic activity against human erythrocytes. HPLC-MS analysis of the extract fractions with the highest trichomonocidal activity revealed the presence of the berberine alkaloid. These novel findings not only support the anti-parasitic potential of medicinal plants but further strengthen the prospects of exploring plants as promising alternative anti-parasitic agents.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Gustavo Ponce García and Dr. Roberto Mercado Hernández for their technical assistance. And au-

thors thank the financial support of the National Council of Science and Technology (CONACYT) through Project CB176853 and the subsidy received for Joel H. Elizondo Luevano (Registration no. 418935).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

REFERENCES

1. Kissinger P. *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. BMC Infect Dis 2015; 15: 307.
2. Wendel KA, Workowski KA. Trichomoniasis: challenges to Appropriate Management. Clin Infect Dis 2007; 44 (suppl): 123-129.
3. Mokdad AH, Forouzanfar MH, Daoud F, El Bcheraoui C, Moradi-Lakeh M, Khalil I, Afshin A, Tuffaha M, Charara R, Barber RM, Wagner J, Cercy K, Kravitz H, Coates MM, Robinson M, Estep K, Steiner C, Jaber S, Mokdad AA, O'Rourke KF, Chew A, Kim P, El Razek MM, Abdalla S, Abd-Allah F, Abraham JP, Abu-Raddad LJ, Abu-Rmeileh NM, Al-Nehmi AA, Akanda AS, Al Ahmadi H, Al Khabouri MJ, Al Lami FH, Al Rayess ZA, Alasfoor D, AlBuhairan FS, Aldhahri SE, Alghnam S, Alhabib S, Al-Hamad N, Ali R, Ali SD, Alkhateeb M, AlMazroa MA, Alomari MA, Al-Raddadi R, Alsharif U, Al-Sheyab N, Alsowaidi S, Al-Thani M, Altirkawi KA, Amare AT, Amini H, Ammar W, Anwari P, Asayesh H, Asghar R, Assabri AM, Assadi R, Bacha U, Badawi A, Bakfalouni T, Basulaiman MO, Bazargan-Hejazi S, Bedi N, Bhakta AR, Bhutta ZA, Bin Abdulhak AA, Boufous S, Bourne RR, Danawi H, Das J, Deribew A, Ding EL, Durrani AM, Elshrek Y, Ibrahim ME, Eshtrati B, Esteghamati A, Faghmous IA, Farzadfar F, Feigl AB, Fereshtehnejad SM, Filip I, Fischer F, Gankpé FG, Ginawi I, Gishu MD, Gupta R, Habash RM, Hafezi-Nejad N, Hamadeh RR, Hamdouni H, Hamidi S, Harb HL, Hassanvand MS, Hedayati MT, Heydarpour P, Hsairi M, Hussein A, Jahanmehr N, Jha V, Jonas JB, Karam NE, Kasaeian A, Kassa NA, Kaul A, Khader Y, Khalifa SE, Khan EA, Khan G, Khoja T, Khosravi A, Kinfu Y, Defo BK, Balaji AL, Lunevicius R, Obermeyer CM, Malekzadeh R, Mansourian M, Marcenis W, Farid HM, Mehari A, Mehio-Sibai A, Memish ZA, Mensah GA, Mohammad KA, Nahas Z, Nasher JT, Nawaz H, Nejari C, Nisar MI, Omer SB, Parsaeian M, Peprah EK, Pervaiz A, Pourmalek F, Qato DM, Qorbani M, Radfar A, Rafay A, Rahimi K, Rahimi-Movaghar V, Rahman SU, Rai RK, Rana SM, Rao SR, Refaat AH, Resnikoff S, Roshandel G, Saade G, Saeedi MY, Sahraini MA, Saleh S, Sanchez-Riera L, Satpathy M, Sepanlou SG, Setegn T, Shaheen A, Shahrz S, Sheikhbahaei S, Shishani K, Sliwa K, Tavakkoli M, Terkawi AS, Uthman OA, Westerman R, Younis MZ, El Sayed Zaki M, Zannad F, Roth GA, Wang H, Naghavi M, Vos T, Al Rabeeah AA, Lopez AD, Murray CJ. Health in times

- of uncertainty in the eastern Mediterranean region, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Glob Heal* 2016; 4: e704-e713.
4. Patel B, Patel P, Patel R. Effect of different extracts from *Celosia argentea* on calcium and phosphate inhibition in vitro. *Int J Pharm Pharm Sci* 2011; 3: 337-339.
 5. Sharanappa R, Vidyasagar GM. Plant profile, phytochemistry and pharmacology of *Argemone Mexicana* Linn. A review. *Int J Pharm Pharm Sci* 2014; 6: 45-53.
 6. Sharma A, Flores-Vallejo R del C, Cardoso-Taketa A, Villarreal ML. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 2017; 208: 264-329.
 7. Bhalke RD, Gosavi SA. Anti-stress and antiallergic effect of *Argemone mexicana* stems in Asthma. *Arch Pharm Sci Res* 2009; 1: 127-129.
 8. Chang YC, Chang FR, Khalil AT, Hsieh PW, Wu YC. Cytotoxic benzophenanthridine and benzylisoquinoline alkaloids from *Argemone mexicana*. *Z Naturforsch C J Biosci* 2003; 58: 521-526.
 9. Magos-guerrero GA, Santiago-mejía J, Carrasco OF. Exploratory studies of some Mexican medicinal plants: cardiovascular effects in rats with and without hypertension. *J Intercult Ethnopharmacol* 2013; 3: 274-279.
 10. Sharma BD, Malhotra S, Bhatia V, Rathee M. Epidemic dropsy in India. *Postgrad Med J* 1999; 75: 657-661.
 11. Rubio-Pina J, Vazquez-Flota F. Pharmaceutical applications of the benzylisoquinoline alkaloids from *Argemone mexicana* L. *Curr Top Med Chem* 2013; 13: 2200-2207.
 12. Willcox ML, Graz B, Falquet J, Sidibé O, Forster M, Diallo D. *Argemone mexicana* decoction for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101: 1190-1198.
 13. Brahmachari G, Gorai D, Roy R. *Argemone mexicana*: chemical and pharmacological aspects. *Rev bras farmacogn* 2013; 23: 559-575.
 14. Malebo HM, Wenzler T, Cal M, Swaleh SM, Omolo MO, Hassanali A, Séquin U, Häussinger D, Dalsgaard P, Hamburger M, Brun R, Ndiege IO. Anti-protozoal activity of aporphine and protoberberine alkaloids from *Annickia kummeriae* (Engl. & Diels) Setten & Maas (Annonaceae). *BMC Complement Altern Med* 2013; 13: 48.
 15. Harborne JB. *Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant analysis*. 3rd ed. London, UK. Chapman and Hall. 1998, pp 54-84.
 16. Mata-Cárdenas BD, Vargas-Villarreal J, González-Salazar F, Palacios-Corona R, Said-Fernández S. A new vial microassay to screen antiprotozoal drugs. *Pharmacologyonline* 2008; 1: 529-537.
 17. Ntie-Kang F, Onguéné PA, Lifongo LL, Ndom JC, Sippl W, Mbazze LM. The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants, part II: a pharmacological evaluation of non-alkaloids and non-terpenoids. *Malar J* 2014; 13: 81.
 18. Kumar G, Karthik L, Bhaskara Rao KV. Hemolytic activity of Indian medicinal plants towards human erythrocytes: an in vitro study. *Elixir Appl Botany* 2011; 40: 5534-5537.
 19. Lakshmi G, Smitha N, Ammu SV, Priya CL, Bhaskara Rao KV. Phytochemical profile, in vitro antioxidant and hemolytic activities of various leaf extract of *Nymphaea Nouchali* Linn: an in vitro study. *Int J Pharm Pharm Sci* 2014; 6: 548-552.
 20. Singh S, Singh TD, Singh VP, Pandey VB. A new benzylisoquinoline alkaloid from *Argemone mexicana*. *Nat Prod Res* 2010; 24: 63-67.
 21. Trujillo-Villanueva K, Rubio-Piña J, Monforte-González M, Ramírez-Benítez E, Vázquez-Flota F. The sequential exposure to jasmonate, salicylic acid and yeast extract promotes sanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* cell cultures. *Biotechnol Lett* 2012; 34: 379-385.
 22. Singh S, Verma M, Malhotra M, Prakash S, Singh TD. Cytotoxicity of alkaloids isolated from *Argemone mexicana* on SW480 human colon cancer cell line. *Pharm Biol* 2016; 54: 740-745.
 23. Kostara I, Carageorgiou H, Varonos D, Tzannetis S. Growth and survival of *Trichomonas vaginalis*. *J Med Microbiol* 1998; 47: 555-560.
 24. Schrader FC, Barho M, Steiner I, Ortmann R, Schlitzer M. The antimalarial pipeline - an update. *Int J Med Microbiol* 2012; 302: 165-171.
 25. Elizondo-Luévano JH, Castro-Ríos R, Sánchez-García E, Hernández-García ME, Vargas-Villarreal J, Rodríguez-Luis OE, Chávez-Montes A. In vitro study of antiamebic activity of methanol extracts of *Argemone mexicana* on trophozoites of *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2018; 2018: 7453787.
 26. Raghav D, Ashraf SM, Mohan L, Rathinasamy K. Berberine induces toxicity in HeLa cells through perturbation of microtubule polymerization by binding to tubulin at a unique site. *Biochemistry* 2017; 56: 2594-2611.
 27. Simoes-pires C, Hostettmann K, Haouala A, Cuendet M, Falquet J, Graz B, Christen P. Reverse pharmacology for developing an anti-malarial phytomedicine. The example of *Argemone mexicana*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2014; 4: 338-346.
 28. Grycová L, Dostál J, Marek R. Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry* 2007; 68: 150-175.
 29. Liu F, Li Z, Shi X, Zhong M. Determination of berberine, palmatine and jatrorrhizine in rabbit plasma by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2011; 56: 1006-1015.
 30. Tang DQ, Zheng XX, Chen X, Yang DZ, Du Q. Quantitative and qualitative analysis of common peaks in chemical fingerprint of Yuanhu Zhitong tablet by HPLC-DAD-MS/MS. *J Pharm Anal* 2014; 4: 96-106.
 31. Birdsall TC, Kelly GS. Therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants. *Altern Med Rev* 1997; 2: 94-103.
 32. Kaneda Y, Torii M, Tanaka T, Aikawa M. In vitro effects of berberine sulphate on the growth and structure of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. *Ann Trop Med Parasitol* 1991; 85: 417-425.
 33. Li Y, Wang H, Si N, Ren W, Han L, Xin S, Zuo R, Wei X, Yang J,

- Zhao H, Bian B. Metabolic profiling analysis of berberine, palmatine, jatrorrhizine, coptisine and epiberberine in zebrafish by ultra-high performance liquid chromatography coupled with LTQ Orbitrap mass spectrometer. *Xenobiotica* 2015; 45: 302-311.
34. Vinjamuri S, Shanker D, Ramesh R, Nagarajan S. In vitro evaluation of hemolytic activity and cell viability assay of hexanoic extracts of *Bridelia ferruginea* Benth. *World J Pharm Pharm Sci* 2015; 4: 1263-1268.
35. Karimi G, Aghasizadeh M, Razavi M, Taghiabadi E. Protective effects of aqueous and ethanolic extracts of *Nigella sativa* L. and *Portulaca oleracea* L. on free radical induced hemolysis of RBCs. *Daru* 2011; 19: 295-300.
36. Kim JH, Han IH, Kim SS, Park SJ, Min DY, Ahn MH, Ryu JS. Interaction between *Trichomonas vaginalis* and the prostate epithelium. *Korean J Parasitol* 2017; 55: 213-218.
37. Ávila-Blanco ME, Rodríguez MG, Moreno Duque JL, Muñoz-Ortega M, Ventura-Juárez J. Amoebicidal activity of essential oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants in an amoebic liver abscess hamster model. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014; 2014: 1-7.

Berberina, curcumina y quercetina como potenciales agentes con capacidad antiparasitaria

Joel H. Elizondo-Luévano^{1*}, Magda E. Hernández-García¹, Oscar A. Pérez-Narváez¹,
Rocío Castro-Ríos² & Abelardo Chávez-Montes^{1*}

1. Departamento de Química, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ciudad Universitaria, C.P. 66455, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México; joel.elizondolv@uanl.edu.mx, magda.hernandezgr@uanl.edu.mx, oscar.pereznr@uanl.edu.mx, abelardo.chavezmn@uanl.edu.mx
2. Departamento de Química, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, C.P. 64460, Monterrey, Nuevo León, México; rocio.castrors@uanl.edu.mx

* Correspondencia

Recibido 30-V-2020. Corregido 15-VII-2020. Aceptado 26-VIII-2020.

ABSTRACT. Berberine, curcumin and quercetin as potential antiparasitic agents. Introduction: The indiscriminate use of antiparasitic agents has resulted in the establishment of resistance to them. Therefore, the development of new treatment alternatives is necessary. Natural products have various qualities as possible adjuvants in therapies against different etiological agents, among which its antiparasitic effects stand out. **Objective:** To evaluate the antiparasitic, antioxidant, cytotoxic, and cytoprotective activity of Berberine (Ber), Curcumin (Cur), and Quercetin (Qr). **Methods:** Analytical grade Ber, Cur, and Qr solutions were prepared, and aliquots were made at different concentrations for their evaluation against *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, and *Strongyloides venezuelensis*. To do this, the mean inhibitory concentration (IC₅₀) was determined, and the antioxidant capacity (EC₅₀) was also determined by the DPPH assay, both using the Probit statistical test. The cytotoxic and cytoprotective activity was determined by the hemolysis technique, Anova and Tukey's test were applied to determine the difference in the means in the treatments evaluated. **Results:** Ber, Cur, and Qr, showed activity against *E. histolytica*, *T. vaginalis*, and *S. venezuelensis* *in-vitro*. Ber presented IC₅₀ of 1.7, 1.2, and 1.9 µM respectively, being more effective compared to Cur with IC₅₀ of 55.3, 40.6, and 13.7 µM, or Qr with IC₅₀ of 147.2, 93.2, and 110.9 µM, however, the best antioxidant activity (EC₅₀ = 1.1 µg/ml), cytoprotective and less hemolytic, was presented by Qr (P < 0.001) compared to the evaluated control. **Conclusions:** The metabolites of natural origin berberine, curcumin, and quercetin, have activity against trophozoites of *E. histolytica*, *T. vaginalis* and larvae of *S. venezuelensis* in low doses comparable to the reference drugs in the case of Ber. Furthermore, these non-synthetic products of natural origin could be the subject of future research to help treat parasitosis, since in low doses, they showed antioxidant activity without showing considerable cytotoxicity in human erythrocytes.

Key words: antiparasitic activity; antiparasitics; berberine; curcumin; quercetin.

Elizondo-Luévano, J.H., Hernández-García, M.E., Pérez-Narváez, O.A., Castro-Ríos, R., & Chávez-Montes, A. (2020). Berberina, curcumina y quercetina como potenciales agentes con capacidad antiparasitaria. *Revista de Biología Tropical*, 68(4), 1241-1249.

Los compuestos naturales representan un papel importante en el descubrimiento de fármacos y el desarrollo de nuevas terapias medicinales, pues, se ha demostrado que las propiedades bioactivas de los productos de

plantas medicinales se atribuyen principalmente a los compuestos fitoquímicos (Altemimi, Lakhssassi, Baharlouei, Watson, & Lightfoot, 2017). Existen informes que indican efectos antiparasitarios de algunos de los compuestos

bioactivos naturales tales como el alcaloide berberina (Ber), siendo uno de los metabolitos más estudiados, el cual posee actividad contra una variedad microorganismos, hongos, virus y parásitos (Gull, Anwar, Sultana, Alcayde, & Nouman, 2015). El polifenol curcumina (Cur), actualmente, está recibiendo considerable atención por sus beneficios para la salud y la capacidad de prevenir las enfermedades de la civilización moderna, como los trastornos cardiovasculares o diabéticos antitumorales y además posee actividad antihelmíntica. La curcumina ha sido ampliamente estudiada ya que posee propiedades en contra de *Plasmodium berghei* y *Schistosoma mansoni* además de poseer actividad sobre *Biomphalaria pfeifferi* caracol y hospedador intermediario de *S. mansoni* (Spencer, Peña-Quintero, Canudas, Bujosa, & Urdaneta, 2018). La quercetina (Qr) es uno de los bioflavonoides más abundante en la naturaleza, el cual es un excelente antioxidante y es conocida por sus efectos antiinflamatorios, antihipertensivos, vasodilatadores, antibacterianas, y principalmente antioxidante (Sharifi-Rad, Epifano, Fiorito, & Álvarez-Suarez, 2020).

Las parasitosis son un problema que afecta gran cantidad de la población humana. Los antiparasitarios derivados de fuentes naturales, pueden ser una alternativa para el tratamiento de infecciones parasitarias. Existen distintos tipos de parásitos que afectan al humano, los cuales están vinculados estrechamente con la pobreza, aislamiento socio-geográfico y la falta de financiamiento para su atención. Entre las parasitosis más comunes se encuentra la amebiasis, la tricomoniasis y la estrongiloidiasis (Pozio, 2020).

Entamoeba histolytica es el causante principal de la amebiasis. Este parásito tiene la capacidad de penetrar en la mucosa intestinal para causar colitis amebiana y propagarse a través de la circulación portal a otros órganos, típicamente el hígado y el cerebro. La infección por este parásito es responsable de 50 millones de casos de amebiasis y 100 000 muertes anualmente (Dingsdag & Hunter, 2018). El metronidazol es el fármaco de elección para el

tratamiento de la amebiasis, el cual tiene más de 25 años de uso y hoy en día se conoce que *E. histolytica* ya ha mostrado resistencia a este fármaco (Ghosh, Aycock, & Schwebke, 2018). *Trichomonas vaginalis* causa la tricomoniasis la cual es la enfermedad de transmisión sexual no viral más común en el mundo. La tricomoniasis se ha asociado con secuelas graves, las más notables son en mujeres embarazadas, el tratamiento de elección se basa en el uso de metronidazol en dosis altas (2-4 g), durante 7 a 14 días (Lee & Ryu, 2019). La estrongiloidiasis es una enfermedad causada por nemátodos del género *Strongyloides* presentes en áreas tropicales y subtropicales con clima adecuado para la supervivencia de las etapas larvares de las especies de este género. Se estima que entre 30 y 100 millones de personas están infectadas en todo el mundo. La ivermectina (IV) es el fármaco de referencia contra la estrongiloidiasis, pero ya se han registrado casos de cepas resistentes (Andersen et al., 2019) and the Global Program to Eliminate LF delivers mass drug administration (MDA).

Conforme a los antecedentes mencionados, los objetivos del presente estudio fueron evaluar la actividad antiparasitaria *in-vitro* de berberina, curcumina y quercetina contra trofozoítos de *E. histolytica*, *T. vaginalis* y larvas de *S. venezuelensis*. Además, evaluar sus capacidades antioxidantes, hemolíticas y citoprotectoras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos: 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Berberina (Ber), Curcumina (Cur), Dimetilsulfóxido (DMSO), Ácido-etilendiaminotetraacético (EDTA), Ivermectina (IV), Metanol absoluto (MeOH), Metronidazol (Met), Quercetina (Qr) y Vitamina E (VitE) se adquirieron en Sigma-Aldrich® (Merck-Chemical®, USA), el suero fetal bovino (SFB) se adquirió en Invitrogen, USA. Todos los reactivos fueron grado analítico.

Cepas: *E. histolytica* HM1-IMSS y *T. vaginalis* GT15 en medio PEHPS fueron

proporcionada por el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS. Las larvas filariformes (L3) de *S. venezuelensis* fueron proporcionadas por el Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca, España, las cuales fueron obtenidas mediante el método de Baermann, de heces de ratas infectadas.

Ensayos de actividad biológica: En tubos de microcentrifuga (Eppendorf®, Germany), se prepararon soluciones madre Ber, Cur y Qr (1 mg/ml) en DMSO el cual nunca fue mayor al 2 % p/v. Estas soluciones se esterilizaron con filtros de membrana de nylon de 0.22 µm (Millipore-Merck®, Germany), a partir de estas, se hicieron las soluciones de trabajo (0.5 a 200 µM) para determinar las IC₅₀.

Para los ensayos con *E. histolytica* y *T. vaginalis* las soluciones se depositaron en viales de vidrio de 2 ml estériles, los cuales contenían una suspensión de trofozoítos de *E. histolytica* (2 x 10⁴ trofozoítos/ml) o *T. vaginalis* (1 x 10⁵ trofozoítos/ml) en fase logarítmica, en medio PEHPS + SFB-10 % y se incubaron a 37 °C durante 72 h y 24 h respectivamente. Después del tiempo de incubación los viales se enfriaron (4 °C / 20 min) para que los trofozoítos se despegaran, se realizó una tinción con azul tripán al 10 % y se realizó una dilución 1:10 con formalina para fijar, contar y medir la viabilidad de los trofozoítos, con un hemocitómetro. Como control positivo se utilizó metronidazol (10 µM) y como control negativo solo medio de cultivo. En cuanto a los ensayos con L3 de *S. venezuelensis*, en una microplaca de 96 pozos se agregaron 100 µl con 150 larvas por pozo las cuales se preincubaron 30 min (28 °C) y finalmente se agregaron 100 µl de los tratamientos previamente descritos. Como control positivo se usó IV (10 µM) y como control negativo agua destilada (Legarda-Ceballos et al., 2016), el ensayo se llevó a cabo durante 72 h a 28 °C y la viabilidad fue evaluada directamente mediante el registro del movimiento larval después de la estimulación con luz natural directa durante dos minutos utilizando un microscopio invertido (CK2, Olympus, Japón),

las larvas se consideraron muertas cuando no se detectó movimiento durante al menos dos minutos de examen detallado.

Actividad antioxidante: Se usó el método de reducción del radical DPPH. Los tratamientos (Tr) fueron evaluados a concentraciones de 20-2 500 µg/ml. El DPPH fue preparado a 125 µM en MeOH absoluto, se tomaron 100 µl de cada concentración respectiva y se agregaron 100 µl del DPPH. Las muestras se dejaron reposar por 30 min en ausencia de luz (Rodríguez-Magaña et al., 2019). La absorbancia (Abs) fue medida a 517 nm con un espectrofotómetro Genesys (Thermo-Scientific™, USA). Como control positivo (C+), se utilizó una solución de VitE y como blanco (Bco) MeOH; el porcentaje de reducción se calculó utilizando la fórmula:

$$\% \text{ Reducción} = [(Abs_{Bco} - Abs_{Tr}) / (Abs_{Bco})] \times 100$$

Ensayo de hemólisis y citoprotección en eritrocitos humanos: Se recolectó sangre de donadores sanos y el suero fue separado. Los eritrocitos, se lavaron con EDTA (1.5 mg/ml de sangre), se mezclaron y centrifugaron (1 000 rpm por 4 min) a temperatura ambiente. Después, la suspensión celular es lavada y centrifugada cuatro veces en solución amortiguadora de fosfatos en proporción 1:1 (PBS 10 mM a pH 7.4) eliminando los sobrenadantes y se prepara una suspensión al 5 % v/v en PBS. Para la evaluación de la hemólisis, la suspensión se incubó con diferentes concentraciones de Ber, Cur o Qr, y de soluciones testigo previamente preparadas en MeOH absoluto (50 a 1 000 µg/ml) en viales de 2 ml durante 30 min a 37 °C y en ausencia de luz, estos fueron catalogados como tratamientos (Tr). Como control negativo (C-) se utilizó eritrocitos sin tratamiento y como control positivo (C+) eritrocitos con agua destilada estéril para producir la hemólisis osmótica en los eritrocitos (Elizondo-Luevano et al., 2020). Para la evaluación del efecto citoprotector, a los tratamientos se les añadió AAPH (150 mM en PBS) más la suspensión de eritrocitos y se incubaron a 37 °C (5 h a 200 rpm) utilizando

una incubadora de rotación MaxQ™ (Thermo-Scientific™, USA), en ausencia de luz. El control negativo (C-), consistió en PBS con la suspensión de eritrocitos sin incluir AAPH y como control positivo (C+), la suspensión de eritrocitos con AAPH. Pasado el tiempo de incubación, los tratamientos se centrifugaron a 13 000 rpm por 4 min a 4 °C, se tomaron 200 µl del sobrenadante y se pusieron en una microplaca transparente de 96 pozos con fondo plano. La hemólisis se determinó mediante la lectura a 540 nm, con un lector de microplacas EPOCH™ (BioTek™, USA), para registrar la absorbancia de cada tratamiento menos la absorbancia presentada por el vehículo (AbsTr) y finalmente, se calculó el porcentaje de hemólisis = $\left(\frac{[(\text{AbsTr} - \text{AbsC-}) / (\text{AbsC+} - \text{AbsC-})] \times 100}{100} \right)$ y citoprotección = $\left(\frac{[1 - (\text{AbsTr} - \text{AbsC-}) / (\text{AbsC+} - \text{AbsC-})] \times 100}{100} \right)$.

Análisis estadístico: La prueba de análisis de varianza (Anova) de una vía se usó para determinar si existía diferencia significativa entre las concentraciones evaluadas y la prueba honesta de significancia Tukey para determinar la diferencia entre las medias en los tratamientos evaluados. La concentración inhibitoria media (IC₅₀) y la concentración efectiva media

(CE₅₀) se determinó por la prueba de Probit, con un intervalo de confianza del 95 %. Los análisis se realizaron con el software SPSS, versión 23.0 (SPSS, Inc. USA). Las diferencias se consideraron significativas a $P < 0.05$. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

RESULTADOS

Actividad biológica: Berberina, curcumi-na y quercetina *in-vitro* mostraron actividades significativas ($P < 0.05$) contra *E. histolytica*, *T. vaginalis* y *S. venezuelensis* (Tabla 1). Mediante la prueba de Tukey, se puede observar que no existe diferencia significativa ($P > 0.05$) entre Ber y los fármacos control contra *E. histolytica* y *S. venezuelensis*; sin embargo, en contra de *T. vaginalis* si hubo diferencia significativa. También se observa que Cur y Qr, no fueron tan efectivos, en comparación con los fármacos control para los tres parásitos ensayados, ya que mostraron alta diferencia significativa ($P < 0.001$).

Capacidad antioxidante: Se observó un diferente desempeño en la capacidad antioxidante de cada uno de los metabolitos (Qr > VitE > Cur > Ber), siendo Qr el más efectivo, incluso

TABLE 1
Actividad *in-vitro* de berberina, curcumina y quercetina sobre *Entamoeba histolytica*,
Trichomona vaginalis y *Strongyloides venezuelensis*

TABLE 1
In-vitro activity of berberine, curcumin and quercetin on *Entamoeba histolytica*,
Trichomona vaginalis and *Strongyloides venezuelensis*

Tratamientos	IC ₅₀ (µM)		
	<i>E. histolytica</i>	<i>T. vaginalis</i>	<i>S. venezuelensis</i>
Control (Met)	1.0 ± 0.2 ^a	0.05 ± 0.0 ^a	-
Control (IV)	-	-	1.3 ± 0.2 ^a
Ber	1.7 ± 0.5 ^a	1.2 ± 0.1 ^b	1.9 ± 0.3 ^a
Cur	55.3 ± 1.1 ^b	40.6 ± 3.2 ^c	13.7 ± 2.1 ^b
Qr	147.2 ± 3.9 ^c	93.2 ± 2.6 ^d	110.9 ± 4.4 ^c
P Anova	< 0.001	< 0.001	< 0.001
F Anova	5.20	16.3	17.4

Los valores se muestran como la Media ± DE ($P < 0.05$). Letras diferentes dentro de la misma columna son significativamente diferentes, analizados vía la prueba de Tukey.

Values are shown as mean ± SD ($P < 0.05$). Different letters within the same column are significantly different analyzed via the Tukey test.

en comparación con el control positivo VitE ($P < 0.001$). La prueba de Tukey arrojó que existe diferencia significativa entre los tratamientos, excepto entre Cur y VitE ($P > 0.05$), los cuales tuvieron capacidad antioxidante similar, pues estos no presentaron diferencia entre sus medias (Tabla 2).

TABLA 2
Capacidad de captación del radical DPPH

Tratamientos	EC ₅₀ (µg/ml)
VitE	16.9 ± 1.4 ^b
Ber	42.0 ± 6.5 ^c
Cur	20.1 ± 0.8 ^b
Qr	1.1 ± 0.1 ^a

Los valores se muestran como la Media ± DE ($P < 0.05$). Letras diferentes dentro de la misma columna son significativamente diferentes, analizados vía la prueba de Tukey.

Values are shown as mean ± SD ($P < 0.05$). Different letters within the same column are significantly different analyzed via the Tukey test.

Actividad hemolítica y citoprotectora:

La actividad hemolítica de Qr *in-vitro* mostró que este metabolito no tiene capacidad lítica significativa de los hematíes ($P = 0.264$), en comparación con el control no tratado, el cual no presentó hemólisis. Para Ber y Cur se presentaron altas diferencia significativa ($P < 0.001$) en comparación con dicho control (Tabla 3). Además se pudo observar que con Ber, que la hemólisis va en aumento conforme aumenta la concentración. Para Cur y Qr no se presentaron altas toxicidades, siendo las hemólisis del 1.9 y 0.7 % respectivamente, las exhibidas la máxima concentración evaluada y sin toxicidad significativa a la concentración más baja. La actividad citoprotectora *in-vitro* de Ber, Cur y Qr, presentaron diferencia significativa ($P < 0.05$), en comparación con el control sin protección de los eritrocitos. Se pudo observar que Ber no fue tan eficiente como Cur y Qr, ya que estos metabolitos a partir de 50 µg/ml, mostraron citoprotección del 71 y 89 % respectivamente, en comparación al control, mientras que Ber presentó 2.2 %.

TABLA 3
Evaluación de la hemólisis y citoprotección de berberina, curcumina y quercetina

µg/ml	Hemólisis			Citoprotección		
	Ber	Cur	Qr	Ber	Cur	Qr
Control	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^d
50	1.0 ± 0.1 ^b	0.5 ± 0.1 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	2.2 ± 0.0 ^d	71.0 ± 2.1 ^d	89.2 ± 2.0 ^c
100	2.4 ± 0.4 ^b	0.9 ± 0.2 ^b	0.0 ± 0.0 ^a	3.7 ± 0.0 ^c	79.4 ± 3.4 ^c	90.5 ± 1.8 ^c
200	8.8 ± 1.6 ^c	1.1 ± 0.2 ^b	0.1 ± 0.0 ^b	7.4 ± 0.1 ^a	81.1 ± 2.0 ^c	94.3 ± 3.1 ^b
400	19.8 ± 1.2 ^d	1.2 ± 0.1 ^b	0.1 ± 0.0 ^b	5.8 ± 0.0 ^b	93.7 ± 4.7 ^b	96.8 ± 3.6 ^b
600	32.9 ± 2.1 ^e	1.3 ± 0.1 ^b	0.2 ± 0.0 ^c	2.5 ± 0.1 ^d	98.3 ± 2.3 ^a	100 ± 0.0 ^a
800	67.9 ± 2.7 ^f	1.5 ± 0.2 ^b	0.4 ± 0.1 ^d	2.1 ± 0.1 ^d	100 ± 0.0 ^a	100 ± 0.0 ^a
1 000	84.7 ± 6.0 ^g	1.9 ± 0.3 ^c	0.7 ± 0.1 ^e	0.7 ± 0.1 ^e	100 ± 0.0 ^a	100 ± 0.0 ^a
SE	11.5	0.2	0.1	0.9	4.4	1.7
P Anova	< 0.001	< 0.001	0.264	< 0.05	< 0.001	< 0.001
F Anova	3.866	17.177	1.646	61.461	35.899	3.865

Valores mostrados como la media ± DE ($P < 0.05$) del porcentaje de hemólisis o citoprotección, más el error estándar (SE). Letras diferentes dentro de la misma columna son significativamente diferentes, analizados vía la prueba de Tukey.

Values shown as the mean ± SD ($P < 0.05$) of the percentage of hemolysis or cytoprotection, plus the standard error (SE). Different letters within the same column are significantly different, analyzed via the Tukey test.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio indican que berberina, curcumina y quercetina poseen actividad en contra de la viabilidad de *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* y *Strongyloides venezuelensis* in-vitro (Tabla 1). En cuanto a la actividad biológica destaca Ber siendo el más efectivo, arrojando IC₅₀ de 1.7, 1.2 y 1.9 µM en contra de *E. histolytica*, *T. vaginalis* y *S. venezuelensis* respectivamente. Lo que indica que posiblemente la estructura química alcaloide favorece la actividad biológica. Existen estudios en productos naturales con extractos ricos en este metabolito que muestran este comportamiento (Elizondo-Luévano et al., 2018). Se ha demostrado que Ber ejerce efectos inhibidores contra *G. lamblia*, *T. vaginalis* y *E. histolytica*, en los que se observó que los trofozoítos se hincharon con presencia de depósitos de glucógeno y con la aparición de vacuolas de forma irregular en el citoplasma con cambios morfológicos en los parásitos, incluyendo agregación de cromatina en el núcleo y agregaciones de pequeñas vacuolas en el citoplasma (Shen, Jiang, Yang, Wang, & Zhu, 2017). Al momento se tienen estudios de la berberina en contra de *S. mansoni*, *Echinococcus multilocularis* y *E. granulosus* pero no sobre *S. venezuelensis*. En dicho estudio Ber mostró ser significativamente igual de eficaz que el fármaco control (Siles-Lucas, Casulli, Cirilli, & Carmena, 2018), muy similar a lo encontrado en nuestro estudio donde se comporta significativamente igual que los fármacos control (metronidazol e ivermectina).

En este contexto, este estudio mostró que moléculas que no pertenecen a la familia de los alcaloides presentan buena actividad biológica en contra de *E. histolytica*, *T. vaginalis* y *S. venezuelensis* a dosis relativamente bajas (IC₅₀ con IC₅₀ 55.3, 40.6 y 13.7 µM respectivamente) como es el caso de curcumina un conocido antioxidante. A diferencia de Ber con esta molécula no existen muchos estudios de su actividad contra parásitos, se conocen más algunos efectos sobre ciertos microorganismos y hongos (Aquino et al., 2016; da Silva et al., 2020).

Existen reportes que indican que en concentraciones de hasta 50 µM atenúan la virulencia de *E. histolytica* sin afectar el crecimiento de trofozoítos ni desencadenar daño hepático, además disminuye la expresión de genes asociados con su virulencia (lectina gal/galnac, ehcp1 y ehcp5) lo cual fue correlacionado con una invasión amebiana significativamente menor (Rangel-Castañeda et al., 2019). Existen otros estudios con Cur en contra de *S. mansoni* en fase adulta y se reporta un 100 % de letalidad a 50 µM, donde se observó reducción de la oviposición, separación inducida de machos y hembras y reducción de la actividad motora (Ndjonka, Rapado, Silber, Liebau, & Wrenger, 2013).

Por otro lado, las afecciones por parásitos están relacionadas con el estrés oxidativo, por ejemplo de forma crítica, en la etiopatología del absceso hepático amebiano. Por tal motivo, este estudio también se evaluó la capacidad antioxidante y los resultados proporcionaron una clara evidencia que los agentes antiparasitarios pueden además ser antioxidantes, pero que no necesariamente ambas actividades se encuentran relacionadas. Así, en esta investigación se compararon las actividades antioxidantes de los metabolitos estudiados contra VitE, control en este tipo de ensayos, debido a su alta actividad antioxidante. Se observó que el mejor antiparasitario, Ber, fue el compuesto menos efectivo como antioxidante (EC₅₀ 42 µg/ml), por otro lado, Qr resultó ser altamente antioxidante (EC₅₀ 1.1 µg/ml), incluso presentó actividad superior a la VitE (EC₅₀ 16.9 µg/ml), sin embargo, este compuesto prácticamente no presentó actividad contra los parásitos. Cabe mencionar, que esta falta de actividad no puede adjudicarse a la incapacidad de penetración ya que ha sido reportado que Qr posee actividad intracelular como antioxidante debido a sus efectos sobre el glutatión (GSH), la actividad enzimática, las vías de transducción de señales y las especies reactivas de oxígeno (ROS) causadas por factores ambientales y toxicológicos, además de que mantiene el equilibrio oxidativo en la célula (Xu, Hu, Wang, & Cui, 2019).

Los ensayos de toxicidad demostraron que la hemólisis causada por Ber fue directamente proporcional a la concentración. Se destaca que a concentraciones menores a 2 μ M, esta molécula es efectiva en contra de los parásitos evaluados, y está muy por debajo de la concentración hemolítica en concordancia con otros estudios. En cuanto a Cur y Qr, estos no presentaron diferencia significativa entre ellos ($P > 0.05$), resultando en una hemólisis menor al 2 % inclusive en la concentración más alta evaluada, por consiguiente, podrían ser clasificados como no tóxicos, ya que la posible hemólisis presentada es relacionada al estrés mecánico al momento de la agitación durante el periodo de incubación (Pozzo et al., 2020). Estos resultados podrían sugerir que las actividades antiparasitaria y de toxicidad celular se relacionan y que presumiblemente el efecto antioxidante está más relacionado con la inocuidad. Además la literatura menciona que compuestos alcaloides como Ber pueden ser tóxicos en altas concentraciones y que incluso puede llegar a intercalarse en el ADN. En contraste, compuestos con grupos fenólicos como Cur y Qr, poseen una alta actividad citoprotectora (Pongkittiphan, Chavasiri, & Supabphol, 2015). En este estudio dicha actividad se evaluó mediante la descomposición térmica del AAPH, ya que es un modelo efectivo para estudiar la inhibición de radicales libres por antioxidantes. Esta prueba es ampliamente utilizada para la evaluación de la disrupción de las membranas celulares inducida por radicales libres de oxígeno (Pozzo et al., 2020). Los resultados mostraron que efectivamente aquellos compuestos que se habían destacado como antioxidantes, es decir Qr y Cur, brindaron una mejor protección ($P < 0.001$) en comparación con Ber, ya que éste no alcanzó más de 3.5 % de protección. Diferentes investigaciones, mencionan que la resistencia de los eritrocitos al estrés oxidativo es debida a la presencia de polifenoles o flavonoides, ya que obstaculizan la difusión de los radicales libres, disminuyendo en gran manera las reacciones de oxidación (Caddeo et al., 2019). Finalmente, los resultados en cuales Cur y Qr no provocaron

hemólisis significativa pero presentaron protección sobre la membrana eritrocitaria, aunados a aquellos que demuestran que Ber no presentó protección sobre los eritrocitos, indican que posiblemente la acción biológica de Ber no es ejercida a nivel de membrana, sino dentro de la célula (Hatia et al., 2014).

Existe un renovado interés en los productos naturales como punto de partida para el descubrimiento de medicamentos para combatir las parasitosis, ya que son escasos los recursos para tratarlas (Yones et al., 2016). Por lo cual es necesario desarrollar nuevos medicamentos contra estas enfermedades que afectan al hombre mundialmente. El uso de productos de origen naturales para el tratamiento de las parasitosis va en aumento, esto debido a que el control y tratamiento, está basado en la aplicación de los mismos medicamentos desde hace varias décadas, es por tal motivo el aumento en el número de investigaciones para el uso de diversas sustancias de origen natural, ya sea vegetal o animal (Hayat, Azam, & Shin, 2016). En la presente investigación se demostró que Ber, Cur y Qr, prometedoras en cuanto a la inhibición de la viabilidad de *E. histolytica*, *T. vaginalis* y *S. venezuelensis* además poseen propiedades antioxidante y citoprotectora. El mecanismo de la actividad de Ber, Cur y Qr, aún no están elucidados, se requieren experimentos en distintas etapas de los parásitos, además de los mecanismos de acción en esas etapas y experimentos en modelos *in-vivo*, para dilucidar los mecanismos de acción. Así mismo, estos estudios podrán llegar a validar el uso de extractos vegetales donde posiblemente las acciones combinadas resulten en beneficios terapéuticos que deberían explorarse.

Declaración de ética: Los autores declaran estar de acuerdo con esta publicación y se han hecho aportes que justifican su autoría. No hay conflicto de interés y se han cumplido los procedimientos éticos pertinentes. El financiamiento viene detallado en la sección de agradecimientos. Los procedimientos empleados cumplen las normas de la Unión Europea y Mexicanas (No.reg.PAE/SA/001).

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado (Proyecto CB176853) a J.H. Elizondo-Luevano (No.reg.418935) y a O.A. Pérez-Narváez (No.reg.745689).

RESUMEN

Introducción: El uso indiscriminado de agentes antiparasitarios ha resultado en el establecimiento de resistencia a ellos. Por lo cual es necesario el desarrollo de nuevas alternativas de tratamiento. Los productos naturales poseen diversas cualidades como posibles coadyuvantes en terapias contra distintos agentes etiológicos, entre los que destaca sus efectos antiparasitarios. **Objetivo:** Evaluar la actividad antiparasitaria, antioxidante, citotóxica y citoprotectora de Berberina (Ber), Curcumina (Cur) y Quercetina (Qr). **Metodología:** Se prepararon soluciones de Ber, Cur y Qr grado analítico y se realizaron alícuotas a diferentes concentraciones para su evaluación en contra de: *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* y *Strongyloides venezuelensis*, para ello, se determinó la concentración inhibitoria media (IC_{50}), además se determinó la capacidad antioxidante (CE_{50}) mediante la prueba de DPPH, ambos por la prueba de Probit. Mediante la técnica de hemólisis se determinó la actividad citotóxica y citoprotectora, se aplicó Anova y la prueba de Tukey para determinar la diferencia de las medias en los tratamientos evaluados. **Resultados:** Ber, Cur y Qr, presentaron actividad en contra de *E. histolytica*, *T. vaginalis* y *S. venezuelensis* *in-vitro*. Ber presentó IC_{50} de 1.7, 1.2 y 1.9 μ M respectivamente siendo más efectivo en comparación de Cur con IC_{50} de 55.3, 40.6 y 13.7 μ M o Qr con IC_{50} de 147.2, 93.2 y 110.9 μ M, sin embargo, la mejor actividad antioxidante (EC_{50} = 1.1 μ g/ml), citoprotectora y menos hemolítica, fue presentada por Qr ($P < 0.001$) en comparación con el control evaluado. **Conclusiones:** Los metabolitos de origen natural berberina, curcumina y quercetina, poseen actividad en contra de trofozoítos de *E. histolytica*, *T. vaginalis* y larvas de *S. venezuelensis* en dosis bajas comparables con los fármacos de referencia para el caso de Ber. Además, estos productos de origen natural, no sintético podrían ser objeto de futuras investigaciones para coadyuvar al tratamiento de parasitosis, ya que, en dosis bajas, mostraron actividad antioxidante sin mostrar hemólisis considerable en eritrocitos humanos.

Palabras clave: actividad antiparasitaria; antiparasitarios; berberina; curcumina; quercetina.

REFERENCIAS

- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D.G., & Lightfoot, D.A. (2017). Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*, 6(4), 42.
- Andersen, B.J., Rosa, B.A., Kupritz, J., Meite, A., Serge, T., Hertz, M.I., ... Weil, G.J. (2019). Systems analysis-based assessment of post-treatment adverse events in lymphatic filariasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(9), 1-27.
- Aquino, P., Gomes-Figueredo, F., Pereira, N., Nascimento, E., Martin, A., Veras, H., ... Menezes, I. (2016). Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica e antibacteriana do extrato metanólico das folhas de *Sideroxylon obtusifolium*. *Acta Biológica Colombiana*, 21(1), 131-140.
- Caddeo, C., Gabriele, M., Fernández-Busquets, X., Valenti, D., Fadda, A.M., Pucci, L., & Manconi, M. (2019). Antioxidant activity of quercetin in Eudragit-coated liposomes for intestinal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 565, 64-69.
- da Silva, A.F., da Rocha, C.Q., da Silva, L., Carvalho Júnior, A.R., Mendes, I., de Araruna, A.B., ... Monteiro, C.A. (2020). Antifungal and Antivirulence Activities of Hydroalcoholic Extract and Fractions of *Platonia insignis* Leaves against Vaginal Isolates of Candida Species. *Pathogens*, 9(2), 84.
- Dingsdag, S.A., & Hunter, N. (2018). Metronidazole: an update on metabolism, structure-cytotoxicity and resistance mechanisms. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(2), 265-279.
- Elizondo-Luévano, J.H., Castro-Ríos, R., Sánchez-García, E., Hernández-García, M.E., Vargas-Villarreal, J., Rodríguez-Luis, O.E., & Chávez-Montes, A. (2018). In Vitro Study of Antiamoebic Activity of Methanol Extracts of *Argemone mexicana* on Trophozoites of *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology = Journal Canadien Des Maladies Infectieuses et de La Microbiologie Medicale*, 2018, 7453787.
- Elizondo-Luevano, J.H., Verde-Star, J., González-Horta, A., Castro-Ríos, R., Hernández-García, M.E., & Chávez-Montes, A. (2020). In Vitro Effect of Methanolic Extract of *Argemone mexicana* against *Trichomonas vaginalis*. *The Korean Journal of Parasitology*, 58(2), 135-145.
- Ghosh, A.P., Aycock, C., & Schwebke, J.R. (2018). In Vitro Study of the Susceptibility of Clinical Isolates of *Trichomonas vaginalis* to Metronidazole and Secnidazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(4), e02329-17.

- Gull, T., Anwar, F., Sultana, B., Alcayde, M.A.C., & Nouman, W. (2015). Capparis species: A potential source of bioactives and high-value components: A review. *Industrial Crops and Products*, 67, 81-96.
- Hatia, S., Septembre-Malaterre, A., Le Sage, F., Badiou-Bénéteau, A., Baret, P., Payet, B., ... Gonthier, M.P. (2014). Evaluation of antioxidant properties of major dietary polyphenols and their protective effect on 3T3-L1 preadipocytes and red blood cells exposed to oxidative stress. *Free Radical Research*, 48(4), 387-401.
- Hayat, F., Azam, A., & Shin, D. (2016). Recent progress on the discovery of antiamebic agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26(21), 5149-5159.
- Lee, J., & Ryu, J.S. (2019). Current Status of Parasite Infections in Indonesia: A Literature Review. *The Korean Journal of Parasitology*, 57(4), 329-339.
- Legarda-Ceballos, A.L., Rojas-Caraballo, J., López-Abán, J., Ruano, A.L., Yepes, E., Gajate, C., Mollinedo, F., & Muro, A. (2016). The alkylphospholipid edelfosine shows activity against *Strongyloides venezuelensis* and induces apoptosis-like cell death. *Acta Tropica*, 162, 180-187.
- Ndjonka, D., Rapado, L.N., Silber, A.M., Liebau, E., & Wrenger, C. (2013). Natural products as a source for treating neglected parasitic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 3395-3439.
- Pongkittiphan, V., Chavasiri, W., & Supabphol, R. (2015). Antioxidant effect of berberine and its phenolic derivatives against human fibrosarcoma cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(13), 5371-5376.
- Pozio, E. (2020). How globalization and climate change could affect foodborne parasites. *Experimental Parasitology*, 208, 107807.
- Pozzo, L., Russo, R., Frassinetti, S., Vizzarri, F., Árvay, J., Vornoli, A., ... Longo, V. (2020). Wild Italian *Prunus spinosa* L. Fruit Exerts In Vitro Antimicrobial Activity and Protects Against In Vitro and In Vivo Oxidative Stress. *Foods*, 9(1), 5.
- Sharifi-Rad, M., Epifano, F., Fiorito, S., & Álvarez-Suarez, J.M. (2020). Phytochemical analysis and biological investigation of *Nepeta juncea* Benth. different extracts. *Plants*, 9(5), 646.
- Rangel-Castañeda, I.A., Carranza-Rosales, P., Guzmán-Delgado, N.E., Hernández-Hernández, J.M., González-Pozos, S., Pérez-Rangel, A., & Castillo-Romero, A. (2019). Curcumin attenuates the pathogenicity of *Entamoeba histolytica* by regulating the expression of virulence factors in an Ex-Vivo model Infection. *Pathogens*, 8(3), 127.
- Rodríguez-Magaña, M.P., Cordero-Pérez, P., Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M.A., Moreno-Peña, D.P., García-Hernández, D.G., & Leos-Rivas, C. (2019). Hypoglycemic Activity of *Tilia americana*, *Borago officinalis*, *Chenopodium nuttalliae*, and *Piper sanctum* on Wistar Rats. *Journal of Diabetes Research*, 2019, 7836820.
- Shen, C.Y., Jiang, J.G., Yang, L., Wang, D.W., & Zhu, W. (2017). Anti-ageing active ingredients from herbs and nutraceuticals used in traditional Chinese medicine: pharmacological mechanisms and implications for drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1395-1425.
- Siles-Lucas, M., Casulli, A., Cirilli, R., & Carmena, D. (2018). Progress in the pharmacological treatment of human cystic and alveolar echinococcosis: Compounds and therapeutic targets. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(4), e0006422.
- Spencer, L.M., Peña-Quintero, A., Canudas, N., Bujosa, I., & Urdaneta, N. (2018). Antimalarial effect of two photo-excitable compounds in a murine model with *Plasmodium berghei* (Haemosporida: Plasmodiidae). *Revista de Biología Tropical*, 66(2), 880-891.
- Xu, D., Hu, M.J., Wang, Y.Q., & Cui, Y.L. (2019). Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules*, 24(6), 1123.
- Yones, D.A., Badary, D.M., Sayed, H.M., Bayoumi, S.A., Khalifa, A.A., & El-Moghazy, A.M. (2016). Comparative Evaluation of Anthelmintic Activity of Edible and Ornamental Pomegranate Ethanolic Extracts against *Schistosoma mansoni*. *BioMed Research International*, 2016, 2872708.

Manuscript Details

Manuscript number	EP_2020_249
Title	Berberine: A nematocidal alkaloid from <i>Argemone mexicana</i> against <i>Strongyloides venezuelensis</i>
Article type	Research Paper

Abstract

Strongyloidiasis is a parasitosis that represents a public health problem, in tropical regions. The present study aimed to investigate the anthelmintic effects of several extracts of *Argemone mexicana*, as well as its main component berberine (Ber) against the third-stage larvae (L3) of *Strongyloides venezuelensis* in-vitro experiments. Also, the anti-hemolytic activity of the extract, fractions and Ber were tested in human erythrocytes. A dose-response anthelmintic bioassay demonstrated Ber as the most effective component, followed by methanolic subfraction (Fr3) and finally the crude extract of *A. mexicana* (Am) showing LC50 response values of 1.80, 101 and 92 µg/mL, respectively. Also, Am, Fr3 and Ber did not produce significant hemolysis against human erythrocytes ($p \leq 0.05$). Am and Fr3 showed cytoprotective capacity at the membrane level ($p \leq 0.05$). Furthermore, Ber was found to have an antioxidant activity of 168.18 µg / mL. According to the results, the Fr3 of *A. mexicana*, and particularly Ber, exhibited potent in-vitro effects against L3 of *S. venezuelensis*, without cytotoxic activity against human erythrocytes and presented good antioxidant capacity. In conclusion the extracts of *A. mexicana* and the main component have activity against *S. venezuelensis*, nevertheless, further studies are required to elucidate the activity in animal models and the mechanism of action.

Keywords Argemone mexicana; berberine; natural products; drug discovery; strongyloidiasis.

Corresponding Author ABELARDO CHAVEZ-MONTES

Corresponding Author's Institution Universidad Autónoma de Nuevo León

Order of Authors Joel Elizondo, Rocío Castro-Ríos, Julio Lopez-Aban, Oscar Gorgojo Galindo, Pedro Fernández-Soto, Belén Vicente, Antonio Muro, ABELARDO CHAVEZ-MONTES

Highlights

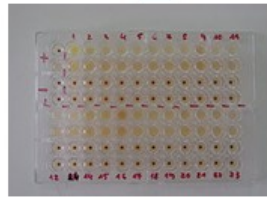
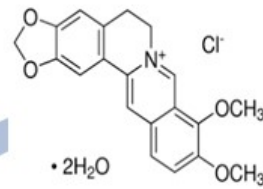
Anthelmintic, cytotoxic and cytoprotective activity of *A. mexicana*.

Development of a new alternative to conventional anthelmintics.

The capacity of the berberine alkaloid is reported, which has a response against the viability of *S. venezuelensis* (L3), being able to compare this activity with the reference drug.

To evaluate the safety of the extract, subfractions, and berberine, an *in-vitro* cytotoxicity test was performed.

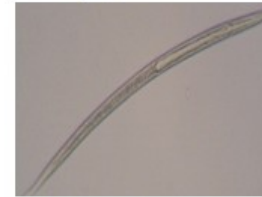
Main component: Berberine



Cytotoxic activity



Argemone mexicana



***In – vitro* activity
against L3**



Antioxidant activity

Berberine: A nematocidal alkaloid from *Argemone mexicana* against *Strongyloides venezuelensis*

Joel H. Elizondo-Luévano ^{a,*}, Rocío Castro-Ríos ^b, Julio López-Abán ^c, Oscar Gorgojo-Galindo ^c, Pedro Fernández-Soto ^c, Belén Vicente ^c, Antonio Muro ^c, Abelardo Chávez-Montes ^{a,*}

^a Departamento de Química, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ciudad Universitaria. C.P. 66455, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.; joel.elizondolv@uanl.edu.mx (J.H.E.L.); abelardo.chavezmn@uanl.edu.mx (A.C.M.).

^b Departamento de Química Analítica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. C.P. 64460, Monterrey, Nuevo León, México.; rocio.castrors@uanl.edu.mx (R.C.R.).

^c Infectious and Tropical Diseases Group (e-INTRO), IBSAL-CIETUS (Biomedical Research Institute of Salamanca-Research Centre for Tropical Diseases at the University of Salamanca), Faculty of Pharmacy, University of Salamanca, Ldo. Mendez Nieto s/n C.P. 37007. Salamanca, Spain jlaban@usal.es (J.L.A.); osgorgal@usal.es (O.G.G.); pfsoto@usal.es (P.F.S.), belvi25@usal.es (B.V.), ama@usal.es (A.M.).

* Correspondence: abelardo.chavezmn@uanl.edu.mx; Tel.: +528183528550 (A.C.M.) and joel.elizondolv@uanl.edu.mx Tel.: +528110683160 (J.H.E.L.).

ABSTRACT

Strongyloidiasis is a parasitosis that represents a public health problem, in tropical regions. The present study aimed to investigate the anthelmintic effects of several extracts of *Argemone mexicana*, as well as its main component berberine (Ber) against the third-stage larvae (L3) of *Strongyloides venezuelensis* *in-vitro* experiments. Also, the anti-hemolytic activity of the extract, fractions and Ber were tested in human erythrocytes. A dose-response anthelmintic bioassay demonstrated Ber as the most effective component, followed by methanolic subfraction (Fr3) and finally the crude extract of *A. mexicana* (Am) showing LC₅₀ response values of 1.80, 101 and 92 µg/mL, respectively. Also, Am, Fr3 and Ber did not produce significant hemolysis against human erythrocytes ($p \leq 0.05$). Am and Fr3 showed cytoprotective capacity at the membrane level ($p \leq 0.05$). Furthermore, Ber was found to have an antioxidant activity of 168.18 µg / mL. According to the results, the Fr3 of *A. mexicana*, and particularly Ber, exhibited potent *in-vitro* effects against L3 of *S. venezuelensis*, without cytotoxic activity against human erythrocytes and presented good antioxidant capacity. In conclusion the extracts of *A. mexicana* and the main component have activity against *S. venezuelensis*, nevertheless, further studies are required to elucidate the activity in animal models and the mechanism of action.

Keywords

Argemone mexicana; berberine; natural products; drug discovery; strongyloidiasis

1. Introduction

Parasitosis caused by helminths is a major public health problem worldwide in developing countries. These diseases are closely linked to poverty and poor hygienic-sanitary conditions, which is why parasitic diseases are more frequent in developing countries. Especially in geographical areas where ecological conditions favor the persistence of parasites besides, it is estimated that approximately more than two billion individuals in the world are home to at least one kind of geo-helminth (FAO/WHO, 2014). Concerning strongyloidiasis, the World Health Organization (WHO) mentions that between 30 - 100 million people are infected in the world; but there is a possibility that these data may be underestimated due to the number of undiagnosed individuals (Bisoffi et al., 2013).

Strongyloidiasis is a helminthiasis caused by *Strongyloides stercoralis* that causes rash and pulmonary symptoms (cough and wheezing), eosinophilia and abdominal pain with diarrhea, this disease is endemic in the poorest tropical and subtropical regions of the world (Siddiqui and Berk, 2001). The clinical strongyloidiasis ranges from asymptomatic to life threatening disseminated hyperinfection depending upon the immune status of the patient. Disseminated hyperinfection involves a massive spread of the parasite in immunosuppression with high mortality (Montes et al., 2010; Schär et al., 2013).

Infective third-stage larvae (L3) penetrate the skin and migrate to the lungs, reaching small intestine where became mature. Parthenogenetic females lay eggs that hatch into rhabditiform larvae (L1), which are eliminated in faeces, some L1 remain and molt into L3 establishing reinfection cycles (Ruano et al., 2005). So far, there are no vaccines for strongyloidiasis, however, some care can help in its prevention such as basic sanitation, adequate disposal of excreta and use of drinking water, hygienic hand washing measures, food disinfection and use of footwear adequate in areas where there is a possibility that the

soil is infected (Wang et al., 2013). *S. venezuelensis* is a laboratory analog of the human parasite, *S. stercoralis* (Sato and Toma, 1990).

The treatment is performed with ivermectin (IV) or albendazole. The treatment of strongyloidiasis is complex because the complete eradication of these helminths. The low parasite load and irregular larval production hampers to identify a true cure only based on examination of fecal matter. The most recommended treatment of strongyloidiasis is to use 200 mg/kg/day of IV by mouth for two days. This treatment must be repeated after 14 days (Gotuzzo et al., 2016). Immunocompromised patients should receive three cycles of treatment with intervals of 14 days between cycles (Corti, 2016). Since the introduction of Iv for the treatment of strongyloidiasis, it was considered the drug of choice for this and have been used against human and veterinary parasites (von Samson-Himmelstjerna, 2012). IV resistant-nematode strains have also been reported in grazing livestock and the issue of decreased susceptibility in human nematodes or the possibility of resistance is also increasing (Parasitol and Article, 2013).

Natural products are an important source of metabolites with multiple diverse biological properties that can be used as active ingredients for the treatment of diseases since the therapeutic use of plants considered medicinal is the basis for the discovery and development of new active ingredients (Patel et al., 2011). In Latin America, plants are an abundant and accessible resource, and traditionally used since pre-Hispanic times, among these plants is *Argemone mexicana* which is an endemic plant of Mexico but is widely distributed in many tropical and subtropical countries (Bhattacharjee et al., 2010). Different parts of this plant have been used for the treatment of different diseases, and several investigations have demonstrated the effect of this plant against fungi, and parasites for example *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* (Brahmachari et al., 2013). The

presence of various types of chemical constituents such as alkaloids has been reported from this plant, with berberine (Ber) (Figure 1) being the most abundant component (Chang et al., 2003). Ber has been used as traditional medicine and dietary supplement. This alkaloid has activity against fungal, yeast, parasite, viral and bacterial infections (Swayze et al., 2007; Verma and Sharma, 2018). As a natural product, its effects against cancer and diabetes are studied (Raju et al., 2019).

In this study, the activity of methanolic extracts of the aerial part of *A. mexicana*, as well as their fractions and berberine were evaluated against L3 filariform larvae of *S. venezuelensis*. The treatment that showed good activity against *S. venezuelensis in-vitro* were selected to evaluate their hemolytic, cytoprotective and antioxidant activity.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical statement

Animal procedures complied with Spanish (RD 53/2013) and European Union (European Directive 2010/63/CE) guidelines regarding animal experimentation for the protection and humane use of laboratory animals. The University of Salamanca's accredited Animal Experimentation Facilities (Registration number: PAE/SA/001) were used for such procedures. The University of Salamanca's Ethics Committee also approved the procedures used in this study (CBE 335). All efforts were made to minimize the animal suffering. The study with human erythrocytes was carried out under the approval of the ethics committee of the Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), College of Medicine (Registration Number HI11002) and under the consent of healthy donors, following the provisions of the Official Mexican Technical Standard NOM-253-SSA1-2012.

2.2. Chemicals used

2,2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH), Benzylpenicillin streptomycin sulfate, Berberine (Ber), Dimethylsulfoxide (DMSO), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and Quercetin were purchased from Sigma-Aldrich (Merck Chemical Co. USA). All other chemicals and solvents were analytical grade.

2.3. Plant material, preparation phytochemical analysis of methanolic extracts

The aerial part of *A. mexicana*, leaves and stems, were collected between January and March 2017 in the city of San Nicolás de Los Garza [25°46'24.38" N & 100°20'59.28"W] in the state of Nuevo León, Mexico. The taxonomic identification of the plant was carried out in the Botany Laboratory of the Facultad de Ciencias Biológicas at the Universidad Autónoma de Nuevo León with Registration number 029127. The aerial part extracts of *A. mexicana*, were obtained as follows the plant was dried at room temperature and macerated with methanol (MeOH). For this, 100 g stems and leaves of *A. mexicana* were ground and successive extractions with absolute MeOH were performed in a flask, using an orbital shaker LAB-LINE 3508, (LAB-LINE Instruments, Inc. USA) with stirring at 100 rpm, at room temperature and solvent replacement every 24 h (3 x 250 mL of absolute MeOH). The extract obtained was filtered with Whatman No. 1 (Merck® KGaA, Germany) filter paper, concentrated under reduced pressure at 45 °C with a rotary evaporator Laborota 4010 (Heidolph Instruments GmbH & CO KG, Germany) and the residual solvent was evaporated at room temperature. Finally, the extract obtained was calculated the percentage of yield, cataloged as Am and stored in dark at 4 °C until later use. For the fractionation process of the raw extract Am, serial partitions were made from the extract using solvents of different polarity, first, the extract was dissolved in 100 mL of hexane by magnetic stirring for 20 min at 25 °C, then was filtered through Whatman No. 1 paper (Fr1), the residue was extracted in

100 mL of CHCl₃ (Fr2), filtered through Whatman No. 1 paper again, and the residual solid was extracted with 50 mL of absolute MeOH and was filtered again (Fr3), finally, the solid obtained was solubilized in 20 mL of distilled water (Fr4), it was frozen at -20 °C and lyophilized at -40 °C and 0.22 mBar in a Free Zone 2.5 Liter Benchtop Freeze Dryer, (LABCONCO, USA). The procedure described was applied to the extract of the aerial part of *A. mexicana*, the yield for the extraction, was calculated with the following formula Yield = (Final weight / Initial weight) X 100.

To determine the functional groups present in the methanolic extract and its active fractions, conventional phytochemical tests were carried out and the following metabolites were detected qualitatively (Singh et al., 2012): potassium permanganate (unsaturations), 2,4-dinitrophenylhydrazine (carbonyl group), Baljet (coumarins and sesquiterpene lactones), Bornträger (quinones), Liebermann-Burchard (triterpenes and sterols), sodium bicarbonate (carboxyl group), ferric chloride (phenols and tannins), saponin test, Shinoda (flavonoids), anthrone (carbohydrates) and Dragendorff (alkaloids).

2.4. *Strongyloides venezuelensis* strain and its maintenance of the life cycle

The filariform infectious larvae (L3) of *S. venezuelensis*, were donated by the Department of Parasitology of the University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, and their life cycle was maintained by serial passes on 4-week-old male Wistar rats with a weight of 150 - 200 g (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain). The animals were kept in the bioterium of the University of Salamanca (registration number PAE / SA / 001) and kept in standard polycarbonate and wire cages with food and water *ad-libitum*, with controlled light and dark periods of 12 h temperature from 23 to 25 °C. The rats were infected subcutaneously with 12,000 third-stage larvae (L3) in 500 µL phosphate-buffered saline (PBS pH 7.4) using a 25-gauge needle syringe. Feces of infected rats (5-18 days post-

infection) were cultured in 250 mL polyethylene containers with vermiculite, mixed with distilled water for 4 - 7 days, with 90% relative humidity at 28 °C, subsequently, the L3 were collected using the Baermann method, the viability of the L3 larvae was verified using an optical microscope before the tests. The larvae were washed 3 times with distilled water containing 100 IU/mL of benzylpenicillin and 0.1 mg/mL of streptomycin sulfate (Martins et al., 2000). Subsequently, they were kept in distilled water containing 0.25% sodium hypochlorite for 10 minutes and then the larval suspension was carried out for the corresponding tests.

2.5. *In-vitro* activity against *S. venezuelensis* third-stage larvae

A batch of 8,000 L3 were rinsed twice with PBS and 150 larvae per well were distributed in 96-well flat bottom culture plates. Extract, fractions, Ber and IV, were solubilized in DMSO (5%) and appropriate dilutions were made to perform assays. Larvae were incubated at 28 °C for 1 hour to allow adaptation, and treated with the methanol extract, fractions and Ber at 1, 10, 50, 100, 250 and 500 µg/mL, and then incubated during 96 h at 28 °C (Legarda-Ceballos et al., 2016a). Mortality was assessed as the lack of any movement detected during 2 min of observation under the microscope with the 4× objective and the 10× eyepiece (magnification 40×), at 0, 24, 48, 72 and 96 h after treatment (Legarda-Ceballos et al., 2016b). As controls, *S. venezuelensis* larvae were incubated in the presence of distilled water (Ctrl -) or treated with ivermectin 10 µM (Ctrl +) (Legarda-Ceballos et al., 2016b).

2.7. *Cytotoxicity by hemolysis test*

The evaluation of cytotoxicity was determined by hemolysis of a suspension of human blood erythrocytes from healthy donors, for which human blood was obtained from healthy donors and allowed to stand at room temperature for 25 min. After removing the serum with a transfer pipette and adding EDTA (1.5 mg/mL blood) to wash out the red blood cells, they

were carefully mixed and separated by centrifugation at 1,000 rpm (5 min / 37°C). The cell pack obtained was washed and centrifuged four times in phosphate buffer (PBS - 10 mM) pH 7.4 with supernatant removal. The erythrocytes obtained were then used to prepare a red cell suspension for the tests at 5% v/v in PBS. For the evaluation of the cytotoxicity of Am, Fr.3, and Ber on the human erythrocytes, the previously prepared red cell suspension was incubated with different concentrations of the extract (100, 200, 400, 600, 800 and 1,000 µg/mL) in 2 mL Eppendorf (Eppendorf® AG, Germany) microcentrifuge tubes, for 30 min at 37°C protected from light, these were labeled as treatments (Tr). As a negative control, a solution of erythrocytes without treatment (C-) was used, the positive control consisted of erythrocytes without treatment with sterile distilled water to produce osmotic hemolysis (C+) (Kumar et al., 2011). Once the incubation time has elapsed, all treatments are centrifuged at 13,000 rpm for 3 minutes at 4 °C. 200 µL of supernatant is taken and placed in a transparent plastic microplate (Costar® Corning Incorporated, New York, USA) of 96 flat-bottomed wells. The degree of hemolysis was determined by spectrophotometric readings at 540 nm, the wavelength of maximum absorption of the hemoglobin released in the supernatant (Lakshmi et al., 2014), on a microplate reader EPOCH Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc., USA). The readings were recorded as the absorbance (Abs) obtained by each treatment (Abs Tr) and finally, the percentage of hemolysis was calculated using the formula: % Hemolysis = [(Abs Tr - Abs C-) / (Abs C+ - Abs C-)] × 100.

2.8. Cytoprotection bioassay of treatments by the AAPH method

For this assay, a suspension of erythrocytes was obtained in the manner described in the hemolysis assay. The suspension was adjusted to 10% v / v with a phosphate buffer pH = 7.4 to be used the same day. Hemolysis was Induced adding 150 mM AAPH reagent prepared in the same phosphate buffer. To evaluate the cytoprotective effect of Am, Fr.3, and Ber, the

previously obtained red blood cell suspension were incubated in 2 mL Eppendorf microcentrifuge tubes with different concentrations of the extract (100, 200, 400, 600, 800 and 1,000 $\mu\text{g} / \text{mL}$) plus AAPH at 200 rpm (5 h / 37 °C) in a rotation incubator THZ-100 (Luzeren Co. China) protected from light, these were classified as treatments (Tr). As a negative control of hemolysis (C-), the phosphate buffer with the suspension of erythrocytes without including AAPH was used and as a positive control, the erythrocyte solution with AAPH (C +) was used (Karimi et al., 2011). After the incubation time had elapsed, all treatments were centrifuged at 13,000 rpm (3 min / 4 °C). 200 μL of supernatant was taken and placed in a flat bottom, transparent 96 well plastic microplate. The degree of hemolysis was determined by spectrophotometric readings at 540 nm, in a microplate reader. The readings were recorded as the absorbance (Abs) obtained by each treatment (Abs Tr) and finally, the percentage of cytoprotection was calculated using the formula: % Cytoprotection = $[1 - (\text{AbsTr} - \text{Abs C-}) / (\text{AbsC+} - \text{AbsC-})] \times 100$.

2.9. Antioxidant Activity by the DPPH free radical scavenging method

The antioxidant activity, the method of reduction of the DPPH radical was used (Ledy et al., 2012). The treatments were evaluated at concentrations of 20 to 2,500 $\mu\text{g/mL}$. The DPPH was prepared to 125 μM in methanol, 100 μL of each sample was taken, and 100 μL of DPPH was added; the samples were allowed to stand for 30 min protected from light (Rodríguez-Magaña et al., 2019). The absorbance at 517 nm was measured using a spectrophotometer Spectronic Genesys 20 (Thermo Fisher Scientific, USA). As a positive control, a solution of quercetin was used and as negative control (C-) MeOH; the reduction percentage was calculated using the formula: % Reduction = $[(\text{Abs C-} - \text{Abs Tr}) / (\text{Abs C-})] \times 100$

2.9. Statistical analysis Data

The results were expressed as the mean and standard error of the mean (SEM). Significant differences between groups were found using the one-way ANOVA test, followed by the post hoc Tukey's honest significance test (HSD) was performed to determine any statistical differences between treated and untreated controls. Also, the Probit test was used to determine the mean lethal concentration (LC_{50}) and half maximal effective concentration (EC_{50}) of the radical scavenging activity. Statistical analyses were performed with SIMFIT Statistical Package 7.4.1 (Manchester University, UK) and SPSS software (IBM – SPSS Ver. 24). All statistical analyses were considered significant at the $p < 0.05$ level.

3. Results

3.1. Phytochemical analysis

The percentages of maceration extraction yield for Am and Fr3, together with the results of the basic phytochemical study, indicate the presence of unsaturations, quinones, triterpenes - sterols, phenols, saponins, flavonoids, carbohydrates and alkaloids for both. In the case of phenols, these were found abundantly in Am and the alkaloids abundantly in the active fraction. The extraction yield of Am was 10.55% and for Fr.3 it was 1.72%.

3.2. In-vitro activity against L3

To investigate the *in vitro* anthelmintic effects of *A. mexicana* as well as its main component, Ber against L3 filariform larvae of *S. venezuelensis* we performed in a microassay technique. All the tested treatments were active against L3. All of the various concentrations of the *A. mexicana* methanolic extract, fractions and berberine revealed significant larvicidal effects against L3 of *S. venezuelensis* ($p < 0.05$) in a dose-dependent manner as compared with the control groups (Table 2). When L3 was exposed in a range of

concentration to Fr3 and Ber the mortality rate was 100% after 24 h of incubation at the concentration of 100, 250 and 500 µg/mL, (data not shown).

3.1. In-vitro activity of *A mexicana* extract, fractions and Berberine against L3

This study was carried out to assess the in vitro anthelmintic effects of *A. mexicana* extract, fractions as well as its main component Ber against L3 filariform larvae of *S. venezuelensis* in comparison with reference drug ivermectin (IV). The *A. mexicana* methanolic extract, fractions and Ber revealed significant larvicidal effects against L3 of *S. venezuelensis* in a dose-dependent manner as compared with the control groups ($p < 0.05$. Table 1). The pure molecule Ber yielded the best nematocidal activity with LC_{50} of 1.8 ± 0.0 µg/mL only 1.5 less activity than those of IV at 72 hours post-treatment. Moreover, the best fraction of *A. mexicana* Fr3, showed LC_{50} of 29.3 ± 3.3 µg/mL. The other extract are actives but in high concentrations.

3.3. Cytotoxic activity by hemolysis test

The cytotoxicity of Am, Fr3, and Ber was evaluated by the human erythrocyte hemolysis test. It was observed that none of the extracts showed to be significantly cytotoxic, since, at the highest concentration tested (1 mg/mL), it was found that Am has hemolysis of 2.8%, and that caused by the Fr3 was of 2.3%. For the lowest concentrations, 100 µg/mL hemolysis presented in erythrocytes was 0.3 and 0.1% respectively. The negative control did not show detectable hemolysis and the positive control consisting of distilled water showed 100% hemolysis (data not shown). Ber was found to be hemolytic at concentrations greater than 200 µg/mL (Table 2).

3.4. Cytoprotection bioassay

The Am, Fr3 and Ber treatments were evaluated for cryoprotection by the AAPH (2,2'-Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride) method using human erythrocytes. The

less cytoprotector treatment was Ber, presenting a maximum percentage of protection of 3.5 % at the concentration of 200 µg/mL. The most effective treatment was Am with a percentage of protection greater than 99% from concentrations of 400 µg/mL or more. And Fr3 was less efficient since its maximum percentage of cytoprotection was given at 100 µg/mL after that the cytoprotection stopped (Table 3).

3.5. Antioxidant bioassay

The results of the antioxidant activity of The Am, Fr3 and Ber treatments determined by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) test showed that the amount of sample necessary to decrease the concentration of DPPH by 50%, EC₅₀, for Am was 312.5 ± 10.5 µg / mL and for Ber (168.2 ± 12.1 µg / mL), however, the quercetin standard was very low (2.1 ± 0.1 µg / mL), while Fr3 presented the highest value (629.5 ± 21.0 µg / mL).

4. Discussion

Chemical compounds derived from plants have been used since the origin of human beings to counteract a number of diseases, recent investigations on plant extracts and plant-derived compounds due to having fewer side effects, and high availability have been shown a successful approach to treat a wide range of diseases (Adebayo and Krettli, 2011). As an alternative, several medicinal plant extracts had been investigated to develop a new drug for human parasites (Vargas et al., 2011). Some of the phytochemical compounds such as flavonoid, phenolics, terpenoid and alkaloids that could be extracted from natural products were suggested to have an effect against different pathogens (Rosmalena et al., 2019). Mexican poppy, *Argemone Mexicana*, grows in Asia and America, the different parts of this plant have been used widely as in ethno-medicine for the treatment and prevention of various diseases including infectious diseases (Rajvaidhya and Pradesh, 2012; Vazquez-

Flota, 2013). Mexican plants such as *A. mexicana* had been investigated as a potential antiparasitic and showed promising results (Singh et al., 2017). In this study, the aerial part of the extract of *A. mexicana* was evaluated, as well as its subfractions recovered using solvents of increasing polarity to determine their *in-vitro* nematocidal, and anticytotoxic properties. Moreover, the main component, berberine was also assessed.

Previous studies have also been carried out on chemical composition of the *A. mexicana* that showed the most important constituents of this plant are isoquinoline alkaloids such as Ber, up to now, various studies have been demonstrated antibacterial, antifungal, antiviral and antiparasitic effects of *A. mexicana* and its main constituent berberine (Elizondo-Luevano et al., 2020). Our results agree with what is expected since the alkaloids are the compounds that stand out for their presence, the yields were greater than 10%, although it should be taken into account that the extraction yield and chemical composition of the plant may differ according to the parts used of the plant, as well as the harvest season and the geographical area (Brahmachari et al., 2013). The natural isoquinoline alkaloid berberine has been employed in Chinese and Mexican Medicine for hundreds of years with a wide range of pharmacological and biochemical effects (Tillhon et al., 2012). Isoquinoline alkaloids as berberine are a group of molecules, which have shown a wide variety of biological functions and have also been assayed against several microorganisms, protozoa and nematodes (Journal, 2014; Rajvaidhya and Pradesh, 2012). Ber is present in a wide variety of medicinal plants such as *Berberis aristata*, *Berberis vulgaris*, *Coptis chinensis*, and *A. mexicana*.

The lethal effective concentrations (LC₅₀) more interesting were found in fraction Fr3 and Ber with high larvicidal activity, in contrast with of *A. mexicana* extract and Fr1, Fr2 and Fr4 fractions. Also, Ber offers additional advantages as an antiparasitic drug and, could

make this drug of interest for the treatment of strongyloidiasis patients coinfectd with *E. histolytica*, *Leishmania* spp. or *Plasmodium falciparum* parasites (Raghav et al., 2017; Wright et al., 2000). In other studies high antiparasitic potential of *A. mexicana* against *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, *Echinococcus granulosus* and some *Leishmania* spp. have been proven (Mahmoudvand et al., 2014; Tillhon et al., 2012; Wright et al., 2000). A previous study showed that a component of the methanolic extract of *A. mexicana* showed the highest amount of Ber compound, and the methanolic subfraction extract showed the highest effect against different protozoa and Dengue virus and with low toxicity (Nonaka et al., 2018; Rosmalena et al., 2019). There are no previous reports in the literature concerning the use of *A. mexicana* or Ber for the treatment of strongyloidiasis. There is also evidence that Ber is active against filarial infections caused by *Brugia malayi*, *Wuchereria bancrofti*, *Onchocerca volvulus* (Rana and Misra-Bhattacharya, 2013), and against protozoa such as *T. vaginalis* and *E. histolytica* (Elizondo-Luevano et al., 2020; Elizondo-Luévano et al., 2018).

Although its activity is not as effective as IV, currently the primary drug for the treatment of strongyloidiasis that is why it is important to find alternatives for the treatment of this disease. These situations make the identification of alternative chemotherapies a high priority issue, our results indicate that Ber significantly reduces worm viability, recovery and kills L3 *in-vitro*. The activity of berberine opens the possibility to the combination of drugs that promote synergistic action or minimize the possibility of resistance of certain strains to drugs (Panic et al., 2014).

In this study extract, fractions and pure molecule did not present significant toxicity according to the criteria of Karimi et al. (Karimi et al., 2011), in which it is mentioned that hemolysis could be related to the mechanical stress of agitation and manipulation.

Relatively low concentrations are used in hemolysis studies, (Lakshmi et al., 2014). In the present research where we tested concentrations of 100 to 1000 µg/mL, none of our extracts can be considered to be significantly ($p < 0.05$) haemolytic (Vinjamuri et al., 2015). Regarding the cytoprotection of human erythrocytes, Am had an important protective activity greater than 99%; these results, with significant concentration-dependent inhibition, is attributed to the high levels of total phenols and its antioxidant effects (García-Becerra et al., 2016). On the other hand, Chiang et al. 2013, mentions that the protective effect depends on the dose and incubation time, in addition, a correlation of the protective effect with the powerful antioxidant capacity (Chiang et al., 2013). It is important to emphasize that the AAPH method is useful for the study of the damage induced by free radicals (Pieroni et al., 2011). Since the decomposition of this compound gives rise to molecular nitrogen and alkyl radicals that react with molecular oxygen to give rise to peroxy radicals which are responsible for predominantly attacking the erythrocyte membranes and at a certain stage during oxidation, these radicals permeate the cells causing hemolysis (Chisté et al., 2014); Shiva Shankar Reddy et al., 2007). The cytoprotective effect of Am seems to be related to its antioxidant capacity since polyphenols seem to be responsible for the resistance of erythrocytes to oxidative stress, they can result in their fluidity hindering the diffusion of free radicals, thus decreasing the kinetics of free radical reactions (Chaudhuri et al., 2007). Due to the fact that the extracts were not toxic to human erythrocytes, it is suggested that the extracts with relevant activity can be considered for purposes for evaluation in a murine model.

5. Conclusions

A. mexicana methanolic extracts of aerial parts and its main compound, Ber, in particular, demonstrated strongyloidicidal activity against the third stage larvae (L3) of *S. venezuelensis* in low concentration *in-vitro* model. In addition to the crude extracts in concentrations of up to 1 mg/mL of *A. mexicana* did not turn out to be hemolytic against human erythrocytes. However, the *in-vivo* efficacy of *A. mexicana* and Ber requires to be evaluated using an animal model of L3 infection. Also, action mechanisms should be studied.

Funding

This research was funded by Santander - USAL Foundation and also to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), and a granted for J.H.E.L. and A.C.M. number project CB176853 (Record No. 418935). Also, this study was supported by the Institute of Health Carlos III, ISCIII, Spain (www.isciii.es), grants: RICET RD16/0027/0018, PI16/01784. B.V.S. is financed by RICET RD16/0027/0018. O.G.G. is financed by EU-FEDER A way to make Europe, the National Youth Guarantee System, Co-financing with the European Social Fund, and the Youth Employment Initiative. BDNS: 427002.

Acknowledgments

A special thanks to Dr. Javier Burguillo, Dr. Juan Hernández Goenaga and M.C. Oscar A. Pérez for their technical assistance.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: J.L.A., P.F.S. and A.M. Performed the experiments: J.H.E.L. and O.G.G. Analyzed the data/materials/analysis tools: R.C.R., B.V. and J.L.A. Writing—original draft preparation, J.H.E.L. and R.C.R. Writing—review and editing: J.L.A. and A.C.M. Funding acquisition/project administration: B.V. and P.F.S. Supervision: A.M., J.L.A. and A.C.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

References

- Adebayo, J.O., Krettli, A.U., 2011. Potential antimalarials from Nigerian plants: A review. *J. Ethnopharmacol.* 133, 289–302. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2010.11.024>
- Bhattacharjee, I., Chatterjee, S.K., Chandra, G., 2010. Isolation and identification of antibacterial components in seed extracts of *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae). *Asian Pac. J. Trop. Med.* 3, 547–551. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(10\)60132-0](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60132-0)
- Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Montresor, A., Requena-Méndez, A., Muñoz, J., Krolewiecki, A.J., Gotuzzo, E., Mena, M.A., Chiodini, P.L., Anselmi, M., Moreira, J., Albonico, M., 2013. *Strongyloides stercoralis*: A Plea for Action. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2214. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002214>
- Brahmachari, G., Gorai, D., Roy, R., 2013. *Argemone mexicana* : chemical and pharmacological aspects #. *Rev. Bras. Farmacogn. - Brazilian Journal Pharmacogn.* 23, 559–575. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000021>
- Chang, Y.C., Chang, F.R., Khalil, A.T., Hsieh, P.W., Wu, Y.C., 2003. Cytotoxic benzophenanthridine and benzyloquinoline alkaloids from *Argemone mexicana*. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 58, 521–526.
- Chaudhuri, S., Banerjee, A., Basu, K., Sengupta, B., Sengupta, P.K., 2007. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects. *Int. J. Biol. Macromol.* 41, 42–48. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2006.12.003>
- Chiang, H.M., Chiu, H.H., Liao, S.T., Chen, Y.T., Chang, H.C., Wen, K.C., 2013. Isoflavonoid-rich *Flemingia macrophylla* extract attenuates UVB-induced skin damage by scavenging reactive oxygen species and inhibiting MAP kinase and MMP expression. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/696879>
- Chisté, R.C., Freitas, M., Mercadante, A.Z., Fernandes, E., 2014. Carotenoids inhibit lipid

443 peroxidation and hemoglobin oxidation, but not the depletion of glutathione induced
 444 by ROS in human erythrocytes. *Life Sci.* 99, 52–60.
 445 <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2014.01.059>

446 Corti, M., 2016. *Strongyloides stercoralis* in immunosuppressed patients. *Arch. Clin. Infect.*
 447 *Dis.* 11, 1–10. <https://doi.org/10.5812/archcid.27510>

448 Elizondo-Luévano, J.H., Castro-Ríos, R., Sánchez-García, E., Hernández-García, M.E.,
 449 Vargas-Villarreal, J., Rodríguez-Luis, O.E., Chávez-Montes, A., 2018. In Vitro Study
 450 of Antiamoebic Activity of Methanol Extracts of *Argemone mexicana* on
 451 Trophozoites of *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. *Can. J. Infect. Dis. Med.*
 452 *Microbiol. = J. Can. des Mal. Infect. la Microbiol. medicale* 2018, 7453787.
 453 <https://doi.org/10.1155/2018/7453787>

454 Elizondo-Luevano, J.H., Verde-Star, J., González-Horta, A., Castro-Ríos, R., Hernández-
 455 García, M.E., Chávez-Montes, A., 2020. In Vitro Effect of Methanolic Extract of
 456 *Argemone mexicana* against *Trichomonas vaginalis* . *Korean J Parasitol* 58, 135–145.
 457 <https://doi.org/10.3347/kjp.2020.58.2.135>

458 FAO/WHO, F. and A.O. of the U.N.H.O., 2014. Multicriteria-based ranking for risk
 459 management of food-borne parasites, Microbiological Risk Assessment Series.

460 García-Becerra, L., Mitjans, M., Rivas-Morales, C., Verde-Star, J., Oranday-Cárdenas, A.,
 461 Vinardell María, P., 2016. Antioxidant comparative effects of two grape pomace
 462 Mexican extracts from vineyards on erythrocytes. *Food Chem.* 194, 1081–1088.
 463 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.131>

464 Gotuzzo, E., Echevarria, J., Ac, W.J., Terashima, A., Samalvides, F., Ja, P., Mn, P., 2016.
 465 Ivermectin versus albendazole or thiabendazole for *Strongyloides stercoralis* infection
 466 (Review). *Cochrane Database Syst. Rev.*
 467 <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007745.pub3>. www.cochranelibrary.com

468 Journal, A., 2014. Phytochemical Screening and Evaluation of Biological Activities of
 469 Some Medicinal Plants of Phagwara , Punjab †.

470 Karimi, G., Aghasizadeh, M., Razavi, M., Taghiabadi, E., 2011. Protective effects of
 471 aqueous and ethanolic extracts of *Nigella sativa* L. and *Portulaca oleracea* L. on free
 472 radical induced hemolysis of RBCs. *Daru* 19, 295–300.

473 Kumar, G., Loganathan, K., Rao, B., 2011. Hemolytic activity of Indian medicinal plants
 474 towards human erythrocytes: An in vitro study. *Elixir Appl. Bot.* 40, 5534–5537.

475 Lakshmi, G., Smitha, N., Ammu, S. V., Priya, C.L., Bhaskara Rao, K. V., 2014.
 476 Phytochemical profile, in vitro antioxidant and hemolytic activities of various leaf
 477 extract of *Nymphaea Nouchali* Linn: An in vitro study. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 6,
 478 548–552.

479 Ledy, G., Catalina, L., Azucena, O., 2012. Free radical scavenging and cytotoxic activity of
 480 five commercial standardized extracts (red wine, green tea, pine bark, polygonum and
 481 pomegranate). *African J. Biotechnol.* 11, 16725-16730–16730.
 482 <https://doi.org/10.5897/AJB12.1739>

483 Legarda-Ceballos, A.L., López-Abán, J., Del Olmo, E., Escarcena, R., Bustos, L.A., Rojas-
 484 Caraballo, J., Vicente, B., Fernández-Soto, P., San Feliciano, A., Muro, A., 2016a. In
 485 vitro and in vivo evaluation of 2-aminoalkanol and 1,2-alkanediamine derivatives
 486 against *Strongyloides venezuelensis*. *Parasites and Vectors* 9.
 487 <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1648-5>

488 Legarda-Ceballos, A.L., Rojas-Caraballo, J., López-Abán, J., Ruano, A.L., Yepes, E.,
 489 Gajate, C., Mollinedo, F., Muro, A., 2016b. The alkylphospholipid edelfosine shows
 490 activity against *Strongyloides venezuelensis* and induces apoptosis-like cell death.
 491 *Acta Trop.* 162, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.07.001>

492 Mahmoudvand, H., Saedi Dezaki, E., Sharififar, F., Ezatpour, B., Jahanbakhsh, S., Fasihi
 493 Harandi, M., 2014. Protoscolecidal effect of *Berberis vulgaris* root extract and its main
 494 compound, berberine in cystic echinococcosis. *Iran. J. Parasitol.* 9, 503–510.

495 Martins, W.A., Melo, A.L., Nicoli, J.R., Cara, D.C., Carvalho, M.A.R., Lana, M.A., Vieira,
 496 E.C., Farias, L.M., 2000. A method of decontaminating *Strongyloides venezuelensis*
 497 larvae for the study of strongyloidiasis in germ-free and conventional mice. *J. Med.*
 498 *Microbiol.* 49, 387–390. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-4-387>

499 Montes, M., Sawhney, C., Barros, N., 2010. *Strongyloides stercoralis*: there but not seen.
 500 *Curr. Opin. Infect. Dis.* 23.

501 Nonaka, M., Murata, Y., Takano, R., Han, Y., Bin Kabir, M.H., Kato, K., 2018. Screening
 502 of a library of traditional Chinese medicines to identify anti-malarial compounds and
 503 extracts. *Malar. J.* 17, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2392-4>

504 Panic, G., Duthaler, U., Speich, B., Keiser, J., 2014. Repurposing drugs for the treatment
 505 and control of helminth infections. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 4, 185–200.
 506 <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.07.002>

507 Parasitol, I.J., Article, R., 2013. Anthelmintics Resistance; How to Overcome it? 8, 18–32.

508 Patel, B., Patel, P., Patel, R., 2011. Effect of different extracts from *Celosia argentea* on
 509 calcium and phosphate inhibition in vitro. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 3, 337–339.

510 Pieroni, L.G., De Rezende, F.M., Ximenes, V.F., Dokkedal, A.L., 2011. Antioxidant
 511 activity and total phenols from the methanolic extract of *miconia albicans* (Sw.) triana
 512 leaves. *Molecules* 16, 9439–9450. <https://doi.org/10.3390/molecules16119439>

513 Raghav, D., Ashraf, S.M., Mohan, L., Rathinasamy, K., 2017. Berberine Induces Toxicity
 514 in HeLa Cells through Perturbation of Microtubule Polymerization by Binding to
 515 Tubulin at a Unique Site. *Biochemistry* 56, 2594–2611.
 516 <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00101>

517 Raju, M., Kulkarni, Y.A., Wairkar, S., 2019. Therapeutic potential and recent delivery
 518 systems of berberine: A wonder molecule. *J. Funct. Foods* 61, 103517.
 519 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103517>

520 Rajvaidhya, S., Pradesh, M., 2012. A review on *Argemone mexicana* linn. An Indian
 521 Medicinal Plant. *Ijpsr* 3, 2494–2501.

522 Rana, A.K., Misra-Bhattacharya, S., 2013. Current drug targets for helminthic diseases.
523 Parasitol. Res. 112, 1819–1831. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3383-6>

524 Rodríguez-Magaña, M.P., Cordero-Pérez, P., Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M.A.,
525 Moreno-Peña, D.P., García-Hernández, D.G., Leos-Rivas, C., 2019. Hypoglycemic
526 activity of *Tilia Americana*, *Borago officinalis*, *Chenopodium nuttalliae*, and *Piper*
527 *sanctum* on wistar rats. J. Diabetes Res. 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7836820>

528 Rosmalena, R., Elya, B., Dewi, B.E., Fithriyah, F., Desti, H., Angelina, M., Hanafi, M.,
529 Lotulung, P.D., Prasasty, V.D., Seto, D., 2019. The antiviral effect of indonesian
530 medicinal plant extracts against dengue virus in vitro and in silico. Pathogens 8, 1–11.
531 <https://doi.org/10.3390/pathogens8020085>

532 Ruano, A.L., Martín, T., Pardo, J., López-Abán, J., Alvarez Muro, A., 2005. Avances en el
533 estudio sobre la estrongiloidosis. Enfermedades Emergentes 7, 102–109.

534 Sato, Y., Toma, H., 1990. *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. Int. J. Parasitol.
535 20, 57–62. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(90\)90173-K](https://doi.org/10.1016/0020-7519(90)90173-K)

536 Schär, F., Trostorf, U., Giardina, F., Khieu, V., Muth, S., Marti, H., Vounatsou, P.,
537 Odermatt, P., 2013. *Strongyloides stercoralis*: Global Distribution and Risk Factors.
538 PLoS Negl. Trop. Dis. 7, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002288>

539 Shiva Shankar Reddy, C.S., Subramanyam, M.V.V., Vani, R., Asha Devi, S., 2007. In vitro
540 models of oxidative stress in rat erythrocytes: Effect of antioxidant supplements.
541 Toxicol. Vitro. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.06.010>

542 Siddiqui, A.A., Berk, S.L., 2001. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* Infection . Clin.
543 Infect. Dis. 33, 1040–1047. <https://doi.org/10.1086/322707>

544 Singh, D., Singh, P., Gupta, A., Solanki, S., Sharma, E., Nema, R., 2012. Qualitative
545 Estimation of Bioactive Compound Present in *Centella Asiatica*: An Important
546 Medicinal Plant. Int. J. Life Sci. Med. Res. 2, 5–7.
547 <https://doi.org/10.5963/lsmr0201002>

548 Singh, S., Verma, M., Malhotra, M., Prakash, S., Singh, S., Verma, M., Malhotra, M.,
549 Prakash, S., Singh, T.D., 2017. Cytotoxicity of alkaloids isolated from *Argemone*
550 *mexicana* on SW480 human colon cancer cell line Cytotoxicity of alkaloids isolated
551 from *Argemone mexicana* on SW480 0209.
552 <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1073334>

553 Swayze, E.E., Griffey, R.H., Bennett, C.F., 2007. Nucleic Acids (Deoxyribonucleic Acid
554 and Ribonucleic Acid). Compr. Med. Chem. II 1037–1052.
555 <https://doi.org/10.1016/B0-08-045044-X/00065-1>

556 Tillhon, M., Guamán Ortiz, L.M., Lombardi, P., Scovassi, A.I., 2012. Berberine: New
557 perspectives for old remedies. Biochem. Pharmacol. 84, 1260–1267.
558 <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.07.018>

559 Vargas, S., Ndjoko Ioset, K., Hay, A.E., Ioset, J.R., Wittlin, S., Hostettmann, K., 2011.
560 Screening medicinal plants for the detection of novel antimalarial products applying
561 the inhibition of β -hematin formation. J. Pharm. Biomed. Anal. 56, 880–886.

562 <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.06.026>

563 Vazquez-Flota, J.R.-P. and F., 2013. Pharmaceutical Applications of the
564 Benzylisoquinoline Alkaloids from *Argemone mexicana* L. *Curr. Top. Med. Chem.*
565 <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/15680266113139990152>

566 Verma, S., Sharma, D., 2018. Berberine: A pioneer remedy for various Ailments 7, 194–
567 200.

568 Vinjamuri, S., Shanker, D., Ramesh, R., Nagarajan, S., 2015. In vitro evaluation of
569 hemolytic activity and cell viability assay of hexanoic extracts of *Bridelia ferruginea*
570 Benth. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 4, 1263–8.

571 von Samson-Himmelstjerna, G., 2012. Anthelmintic resistance in equine parasites –
572 detection, potential clinical relevance and implications for control. *Vet. Parasitol.* 185,
573 2–8. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2011.10.010>

574 Wang, C., Xu, J., Zhou, X., Li, J., Yan, G., James, A.A., Chen, X., 2013. Review:
575 Strongyloidiasis: An emerging infectious disease in China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*
576 88, 420–425. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0596>

577 Wright, C.W., Marshall, S.J., Russell, P.F., Anderson, M.M., Phillipson, J.D., Kirby, G.C.,
578 Warhurst, D.C., Schiff, J.L., 2000. In vitro antiplasmodial, antiamoebic, and cytotoxic
579 activities of some monomeric isoquinoline alkaloids. *J. Nat. Prod.* 63, 1638–1640.
580 <https://doi.org/10.1021/np000144r>

Table 1. Lethal concentration ($\mu\text{g/mL}$) that causes the death of 50% (LC_{50}) at a 95% confidence interval of L3 treated with the extract (Am), fractions (Fr1, Fr2, Fr3, Fr4) and Berberine (Ber) compared with the effects of the reference drug ivermectin (IV).

Treatment	Incubation time (h)			
	24	48	72	96
Am	186.5 ± 3.6	136.9 ± 7.6	101.0 ± 5.5	92.1 ± 4.7
Fr1	ND	127.7 ± 3.8	77.2 ± 2.5	25.4 ± 3.2
Fr2	ND	194.1 ± 0.8	60.9 ± 3.8	44.4 ± 2.1
Fr3	58.9 ± 3.8	$31.4 \pm 2.4^* P < 0.05$	$29.3 \pm 3.3^* P < 0.05$	$19.5 \pm 2.1^* P < 0.001$
Fr4	ND	ND	224.7 ± 0.3	154.5 ± 1.4
Ber	$6.6 \pm 0.5^* P < 0.001$	$3.2 \pm 0.6^* P < 0.001$	$1.8 \pm 0.0^* P < 0.001$	$1.6 \pm 0.1^* P < 0.001$
IV	$11.5 \pm 0.8^* P < 0.001$	$4.9 \pm 0.3^* P < 0.001$	$1.2 \pm 0.0^* P < 0.001$	$0.9 \pm 0.0^* P < 0.001$
ANOVA	$F_{(6,21)} = 5.9, P < 0.001$	$F_{(6,21)} = 33, P = 0.08$	$F_{(6,21)} = 6.9, P = 0.05$	$F_{(6,21)} = 97.8, P = 0.001$

ANOVA and post-hoc Tukey's honest significance (HSD) test was used. *Significant activity against L3 Larvae compared with to non-treated L3. ND: Activities lower than 50% in all the range tested. Results are depicted as Mean \pm SD.

Table 2. Evaluation of the cytotoxicity of the *A. mexicana* extract (Am), and Fr3 extract and berberine (Ber) by the hemolysis test.

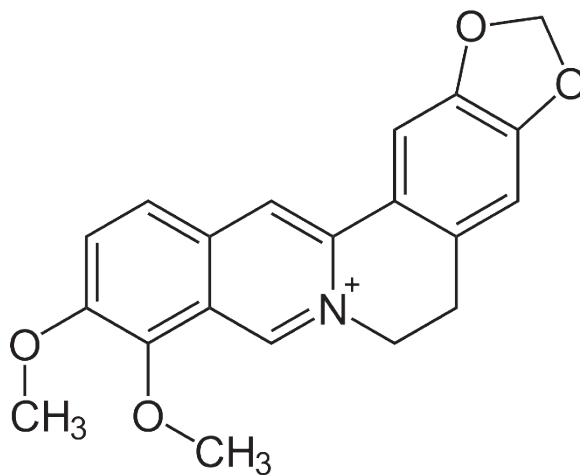
Concentration (µg/mL)	Treatments			
	Control	Am	Fr3	Ber
100	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	2.8 ± 0.4
200	0.3 ± 0.0	0.8 ± 0.1	0.4 ± 0.1	11.8 ± 1.4* $P < 0.001$
400	0.3 ± 0.0	1.2 ± 0.5	0.8 ± 0.0	23.8 ± 3.2* $P < 0.001$
600	0.6 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.3	55.9 ± 4.1* $P < 0.001$
800	0.7 ± 0.2	2.1 ± 0.4	2.1 ± 0.2	72.9 ± 2.3* $P < 0.001$
1000	0.7 ± 0.1	2.8 ± 0.4	2.3 ± 0.3	90.2 ± 9.3* $P < 0.001$
ANOVA	$F_{(2,15)} = 7.5,$ $P = 0.25$	$F_{(2,15)} = 7.5,$ $P = 1.00$	$F_{(2,15)} = 7.5,$ $P = 0.99$	$F_{(2,15)} = 99.0,$ $P < 0.001$

ANOVA and post-hoc Tukey's honest significance (HSD) test was used. *Significant differences in comparison with the control group. The results are given in % of hemolysis in duplicate and a minimum of three repetitions in different times. The values are shown as the mean ± SD.

Table 3. Evaluation of the cytoprotection of the *A. mexicana* extract (Am), and Fr3 extract and berberine (Ber) by the AAPH method.

Concentration($\mu\text{g/mL}$)	Treatments			
	AAPH	Am	Fr3	Ber
100	0.0 ± 0.0	$23.6 \pm 3.5^* P < 0.001$	$29.8 \pm 2.4^* P < 0.001$	3.5 ± 0.0
200	0.0 ± 0.0	$77.0 \pm 2.3^* P < 0.001$	$4.8 \pm 0.3^* P < 0.05$	2.6 ± 0.1
400	0.0 ± 0.0	$99.1 \pm 1.3^* P < 0.001$	$4.2 \pm 0.2^* P < 0.05$	1.6 ± 0.0
600	0.0 ± 0.0	$99.3 \pm 0.2^* P < 0.001$	2.9 ± 0.3	0.9 ± 0.1
800	0.0 ± 0.0	$99.3 \pm 0.1^* P < 0.001$	1.6 ± 0.0	0.8 ± 0.1
1000	0.0 ± 0.0	$99.7 \pm 3.1^* P < 0.001$	0.6 ± 0.1	0.1 ± 0.1
ANOVA	$F_{(3,68)} = 0.59,$ $P = 1.00$	$F_{(3,68)} = 29.0,$ $P = 0.00$	$F_{(3,68)} = 3.28,$ $P = 0.50$	$F_{(3,68)} = 0.58,$ $P = 0.99$

ANOVA and post-hoc Tukey's honest significance (HSD) test was used. *Significant differences in comparison with the control group (AAPH). The results are given in percentage of cytoprotection (%) in duplicate and a minimum of three repetitions in different times. The values are shown as the mean \pm SD.



654

655 **Figure 1.** The chemical structure of the alkaloid berberine (Average mass: 336.361).

656

657

Declaration of interests

☒ The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

☐ The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

Joel Horacio ELIZONDO-LUEVANO (J.H.E.L.): Creation and writing the initial draft and performing the experiments.

Rocío CASTRO-RÍOS (R.C.R.): Evidence collection and Tools.

Julio LÓPEZ-ABAN (J.L.A.): Ideas; formulation and conceptualization of overarching research goals and aims.

Oscar GORGOJO-GALINDO (O.G.G.): Analyzed the data, materials and analysis tools.

Pedro FERNÁNDEZ-SOTO: Funding acquisition and project administration.

Ana Belén VICENTE-SANTIAGO (B.V.): Provision of study materials, reagents, materials and instrumentation.

Antonio MURO-ÁLVAREZ (A.M.): Conducting the research and supervision.

Abelardo CHÁVEZ-MONTES (A.C.M.): Writing – review, editing and correspondence.

SN Applied Sciences

Eudragit® Polymeric Nanoparticles by Nanoprecipitation: Influence of basic variables --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	SNAS-D-20-06315	
Full Title:	Eudragit® Polymeric Nanoparticles by Nanoprecipitation: Influence of basic variables	
Article Type:	Research Article	
Section/Category:	Interdisciplinary: TC: Advanced Nanomaterials	
Funding Information:	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CB176853)	Ph.D. Abelardo Chávez-Montes
Abstract:	<p>From a pharmaceutical point of view, the size (S) of polymeric nanoparticles (PN) is a critical parameter in their interaction with biological systems. The main objective of this study was to establish the influence of the organic phase (OP) and aqueous phase (AP) volumes as well as the polymer amount (PA) on the size of the PN and the polydispersity index (PDI) prepared by the nanoprecipitation method and also to evaluate the cytotoxic activity of the polymers. PN was formed from preformed polymers derived from methacrylic acid with polyvinyl alcohol (PVA) as a surfactant. The nanoprecipitation technique allowed to obtain particles with sizes smaller than 200 nm and polydispersity index lower than 0.2 and the significant impact ($p < 0.05$) of the three variables in the methodology was established. The cytotoxic potential of the polymers was evaluated in human erythrocytes, where none of the polymers exhibited significant cytotoxic activity ($p < 0.001$). In conclusion by the nanoprecipitation technique, it is possible to prepare PN based on Eudragit ® polymers, with defined and homogeneous sizes.</p>	
Keywords:	Eudragit; Nanoparticle; Nano-emulsion; Nanoprecipitation; Polydispersity; Solvent Displacement.	
Corresponding Author:	Abelardo Chávez-Montes, Ph.D. Universidad Autónoma de Nuevo León San Nicolás de los Garza, Nuevo León MEXICO	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidad Autónoma de Nuevo León	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Joel Horacio Elizondo Luevano, Ph.D	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Joel Horacio Elizondo Luevano, Ph.D Eduardo Sánchez-García, Ph.D María Julia Verde-Star, Ph.D. Rocío Castro-Ríos, Ph.D Abelardo Chávez-Montes, Ph.D.	
Order of Authors Secondary Information:		
Author Comments:		
Suggested Reviewers:	Magda Elizabeth Hernández García, Ph.D. Researcher, Instituto Mexicano del Seguro Social magda.hernandez@imss.gob.mx She has extensive experience in the area of analytical and pharmaceutical chemistry, in addition to the design of new vaccines. Diana Elena Aguirre Cavazos, Ph.D.	

	<p>Universidad Ciudadana de Nuevo León – UCNL. México. diana.aguirre@ucnl.edu.mx Experience in drug carriers such as nanoemulsions and nanoparticles.</p>
Order of Authors (with Contributor Roles):	Joel Horacio Elizondo Luevano, Ph.D (Investigation: Equal; Writing – original draft: Lead; Writing – review & editing: Equal)
	Eduardo Sánchez-García, Ph.D (Funding acquisition: Supporting; Investigation: Equal; Methodology: Equal)
	María Julia Verde-Star, Ph.D. (Resources: Equal; Software: Lead; Visualization: Equal)
	Rocío Castro-Ríos, Ph.D (Formal analysis: Supporting; Methodology: Equal; Validation: Lead)
	Abelardo Chávez-Montes, Ph.D. (Funding acquisition: Supporting; Supervision: Lead; Writing – review & editing: Lead)

Eudragit® Polymeric Nanoparticles by Nanoprecipitation: Influence of basic variables

Running title: Nanoprecipitation: Influence of variables

Joel Horacio Elizondo-Luévano¹ (ORCID: 0000-0003-2954-5939), Eduardo Sánchez-García¹ (ORCID: 0000-0001-5751-9848), María Julia Verde-Star¹ (ORCID: 0000-0001-8837-2682), Rocío Castro-Ríos² (ORCID: 0000-0001-8753-9065), Abelardo Chávez-Montes^{1*} (ORCID: 0000-0002-3948-4247)

¹ Department of Chemistry, Faculty of Biological Sciences, Autonomous University of Nuevo León. C.P. 66455, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México; joel.elizondolv@uanl.edu.mx, eduardo.sanchezgrc@uanl.edu.mx, maria.verdest@uanl.edu.mx, abelardo.chavezmn@uanl.edu.mx

² Department of Analytical Chemistry, Faculty of Medicine, Autonomous University of Nuevo León. C.P. 64460, Monterrey, Nuevo León, México; rocio.castrors@uanl.edu.mx

* **Correspondence:** Abelardo Chávez-Montes, Tel:+528183528550, abelardo.chavezmn@uanl.edu.mx

Acknowledgment The authors appreciate the Editor and Editorial Board members. This work was supported by the National Council for Science and Technology (CONACYT) under the project CB176853, provided for the Joel H. Elizondo doctorate project (Reg No.418935).

Abstract

From a pharmaceutical point of view, the size (S) of polymeric nanoparticles (PN) is a critical parameter in their interaction with biological systems. The main objective of this study was to establish the influence of the organic phase (OP) and aqueous phase (AP) volumes as well as the polymer amount (PA) on the size of the PN and the polydispersity index (PDI) prepared by the nanoprecipitation method and also to evaluate the cytotoxic activity of the polymers. For this purpose, PN was formed from preformed polymers derived from methacrylic acid with polyvinyl alcohol (PVA) as a surfactant. The nanoprecipitation technique allowed to obtain particles with sizes smaller than 200 nm and polydispersity index lower than 0.2 and the significant impact ($p < 0.05$) of the three variables in the methodology was established. The cytotoxic potential of the polymers was evaluated in human erythrocytes, where none of the polymers exhibited significant cytotoxic activity ($p < 0.001$). In conclusion by the nanoprecipitation technique, it is possible to prepare PN based on Eudragit® polymers, with defined and homogeneous sizes.

Article Highlights

- The nanoprecipitation technique allows to quickly obtain nanoparticles of defined size.
- It is possible to vary the index of size and polydispersity by increasing or decreasing the organic phase, aqueous phase, and polymer mass variants.
- Eudragit polymers are not toxic against human erythrocytes.

Keywords Eudragit; Nanoparticle; Nano-emulsion; Nanoprecipitation; Polydispersity;
Solvent Displacement.

List of abbreviations

PN: Polymeric nanoparticles

S: Size

OP: Organic phase ratio

AP: Aqueous phase

PA: Polymer amount

nm: Nanometers

PDI: Polydispersity index

1 Introduction

Polymeric nanoparticles (PN) or nanocarriers, have been extensively studied in the pharmaceutical field as active ingredients delivery systems with promising future. This is because this type of carrier, improves drug stability, bioavailability, and targeting due to its characteristics such as the particle size (S), which is between 100 and 500 nm. This range of particle size helps absorption and improves the biological substrate interaction giving the delivery system an advantage such as increased surface of contact, capacity of bio-targeting to specific organs/tissues, drug absorption in target tissue, reducing adverse effects of the drug due to reduction of dosages, and easy passage into the cell, bacteria, or protozoan [1]. These types of pharmaceutical carriers, are generally made of natural or synthetic biodegradable polymers and form structures with a diverse chemical nature, where the drug can be encapsulated, adhered or absorbed [2].

There is research of PN formulations made with polymers derived from methacrylic acid, where different types of drugs are encapsulated. These formulations have shown to incorporate a wide variety of active ingredients with an encapsulation efficiency of between 60 and 90% for intravenous or respiratory applications showing efficacy in both, in vitro and in vivo studies, showing low toxicity, compared with the non-encapsulated form. Therefore, this type of drug carrier and nano-formulations represent an excellent option for the treatment of different diseases [3, 4].

Drug encapsulation could increase the stability of active substances and protect sensitive substances from chemical degradation induced by pH or ultraviolet light. Furthermore, this improves the efficacy, specificity, and tolerability of the drug [5]. Eudragit® is a versatile range of polymers for drug delivery that is used to improve the stability and bioavailability of various substances, these anionic copolymers are made of methacrylic acid and methyl methacrylate and are widely used for various PN formulations, They are small particles that vary from 1 to 100 nm [6]. These Eudragit® family polymers can protect the drug that breaks down to an acidic pH (stomach), allowing its release only at a pH above 6.0, with its absorption in the intestine. These polymers have been successfully used to increase the therapeutic effects and bioavailability of different substances, such as curcumin, insulin, and pantoprazole, among others [5–7].

Obtaining PN with defined size and polydispersity index (PDI) is achieved by modifying different experimental variables of the method used to prepare PN. There are different PN manufacturing techniques, including evaporation of the emulsion, diffusion of the emulsion, and solvent displacement to produce nanoparticles from preformed polymers. Of these methods, solvent displacement, also called nanoprecipitation, is a

one-step manufacturing process, making it the first-choice method as it is also reproducible, fast, and economical for the preparation of monodisperse nanoparticles in a size range of approximately 50 to 300 nm [8]. However, although this technique has great benefits, the influence of variables that are implicit in the formation of nanoparticles has not been fully addressed [9].

The present study is focused on the evaluation of the main parameters influencing the size and PDI of PN performed by methacrylic acid-derived polymers by the nanoprecipitation technique (Fig. 1). Three variables were evaluated: the effect of the organic phase ratio (OP), the effect of the aqueous phase (AP) and the effect of polymer amount (PA). Finally, the cytotoxic activity of the formulations at different concentrations was evaluated.

2 Materials and Methods

2.1 Chemicals used

Polyvinyl alcohol (PVA, Mowiol R^o4-88) donated by Clariant México, polymers derived from methacrylate Eudragit[®] EPO, E100, L100 and L100-55 donated by Helm México were used in this study. The rest of the solvents and reagents used were analytical grade.

2.2 Polymeric nanoparticles

PN was prepared by the nanoprecipitation technique [10], for this, an organic phase (OP) was used which contained the polymer dissolved and was miscible with water. This polymer solution was injected into an aqueous phase (AP) containing 2% w/w PVA under constant magnetic stirring (250 rpm). Different Eudragit[®] polymers were

used (Fig. 2): EPO, E100, L100 that was dissolved in absolute methanol (MeOH), and L100-55 that was dissolved in acetone. The diffusion of the OP was carried out by injection into the AP, which favored the aggregation of the nanoparticle-forming polymer. The PN suspension obtained was evaporated under reduced pressure with a Laborota-4003 rotary evaporator (Heidolph, Germany) for the removal of the solvents and finally, the physical characterization of the NPs was continued. The variables evaluated in this study were the following: variation of the volume of OP over AP and constant amount of polymer (PA) (12 mL + 50 mg, respectively), variation of the volume of AP over OP and constant PA (12 mL + 50 mg, respectively) and variation of the PA over constant OP and AP volumes (12 mL each). The amounts tested were as follows: for OP and AP the volumes of 5, 8, 10, 12, 15, 18, and 20 mL and in the case of the PA, were 5, 10, 25, 50, 75, and 100 mg of each polymer. Each batch was made in triplicate in at least 3 different experiments. The size and PDI of PN formulations were determined by photonic correlation spectroscopy in a Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, USA), from an aliquot of each batch diluted in Milli-Q water.

2.3 Cytotoxicity assay

The cytotoxicity was determined by hemolysis of a suspension of human blood erythrocytes. Human blood was obtained from healthy donors and allowed to stand at room temperature for 20 minutes. After removing the serum, the cell pack obtained was washed and centrifuged four times in phosphate buffer (PBS 10 mM/pH 7.4) with supernatant removal [11]. The erythrocytes obtained were then used to prepare a red cell suspension for the tests at 5% v/v in PBS. For the evaluation of the cytotoxicity, the previously prepared red cell suspension was incubated with different concentrations of the polymers (100 to 1,000 µg/mL) in Eppendorf® tubes (Eppendorf®, Germany), for 30

min at 37 °C protected from light, these were labeled as treatments (Tr). As a Blank, a solution of erythrocytes without treatment was used, the positive control (C+) consisted of erythrocytes without treatment with sterile distilled water to produce osmotic hemolysis [12]. Once the incubation time has elapsed, all treatments are centrifuged at 12,000 rpm (3 min / 4 °C). 200 µL of supernatant was taken and placed in a microplate (Costar®, USA) of 96 flat-bottomed wells. The degree of hemolysis was determined by spectrophotometric readings at 540 nm, the wavelength of maximum absorption of the hemoglobin released in the supernatant [13], by an ELISA reader (BioTek-ELX800). The readings were recorded as the absorbance (Abs) obtained by each treatment (TrAbs) and finally, the percentage of hemolysis was calculated by the formula:

$$\text{Hemolysis \%} = [(\text{TrAbs} - \text{BlankAbs}) / (\text{C+Abs} - \text{BlankAbs})] \times 100$$

2.4 Statistical analysis

For the statistical evaluation of the S and PDI of PN in the different combinations, an analysis of 2-way variance (2-way ANOVA) was applied and for the evaluation of the cytotoxic activity of the formulants, the analysis of 1-way variance (1-way ANOVA) was performed, followed by Tukey's post hoc HSD test (Honestly-significant-difference) to determine the statistical difference between the treatments, with a $p \leq 0.05$, using SPSS software, version 24.0 (IBM Inc. USA), all trials were performed in triplicate in at least three different experiments.

3 Results

3.1 Polymeric nanoparticles preparation

The particle size obtained by the solvent displacement technique was measured for four different polymers for pharmaceutical use derived from methacrylic acid with different

preparation conditions. In the first stage, the effect of the volume of the organic phase used was kept keeping constant, both the volume of the aqueous phase and the amount of polymer (12 mL of AP + 50 mg of PA, respectively). Fig. 3a shows that regardless of the polymer used in the first increments of organic phase volume (from 5 mL to 18 mL), the particle size decreases and then has little or no influence. When the influence of this variable on the PDI of the EPO and E100 polymers is observed, there is a slight decrease as the volume of organic phase used increases. For the other two polymers, the trend is not very evident and there seems to be a minimum of dispersion in size at the center of the range evaluated with increasing extremes, that is, at very small or large volumes of the organic phase ($p \leq 0.05$).

Subsequently, the volume of the organic phase was fixed at 12 mL to evaluate the effect of the volume of the aqueous phase, while also maintaining the polymer mass at 50 mg. In fig. 3b only in the first increments, this variable has a slight influence on E100, L100, and L100-55. It was observed that increasing the volume of the aqueous phase decreases the particle size. The Influence was also shown for the EPO polymer, but only in the first increases in the volume of the aqueous phase, although with a greater effect on the decrease in size. The influence of this variable on the homogeneity of the particle size is not very clear except for the EPO polymer, which exhibits a decrease in the depression index as the volume of the aqueous phase increases.

Finally, the amount of polymer from 5 to 100 mg was evaluated using constant volumes of 12 mL for each of the phases. Fig. 4c shows that E100 and L100-55 polymers tend to form larger particles as the amount of polymer mass increases. The other two polymers evaluated EPO and L100 show behavior of a slight decrease in size at the beginning ($p \leq 0.001$), later, as the mass of polymer used increases, the particle

size also increases ($p \leq 0.001$). Fig. 4c shows the influence of this variable on the homogeneity of size in the populations of particles in each formulation ($p \leq 0.001$). It is shown that there is only a clear relationship between these two variables for EPO and L100-55 polymers, although inversely. As the polymer mass increases in the EPO formulations, the polydispersity index decreases ($p \leq 0.001$), while for the L100-55 polymer it increases.

3.2 Determination of the cytotoxicity of the PN

The cytotoxicity of PN based on the different Eudragit® polymer polymers was evaluated by the human erythrocyte hemolysis test. The formulations were mixed with PBS until obtaining the different concentrations to be evaluated, the erythrocytes were treated with the different concentrations of the polymers and the absorbance of the supernatant was measured at 540 nm. It was observed that none of the four polymers and in the different concentrations analyzed showed to be significantly ($p \leq 0.001$) cytotoxic. The positive control consisting of distilled water showed 100% hemolysis. Polymer-induced cytotoxicity in erythrocytes is expressed as a percentage of hemolysis (Table 1).

4 Discussion

Solvent displacement technique also commonly known as nanoprecipitation allows the formation of both nanocapsules and nanospheres [10]. To carry out this method, two miscible solvents are required, generally one organic and the other aqueous, and that both the polymer and the drug involved are soluble in only one of them, commonly in the organic system (OP), while in the second, water or aqueous solution both are

insoluble (AP) [14]. When the organic solution of the polymer is added to the non-solvent, generally by injection into the aqueous phase, the polymer undergoes rapid desolvation, which causes its precipitation after the organic solvent diffuses into the medium of dispersion, causing immediate entrapment of the drug [15].

The apparently simple process of preparing PN by the nanoprecipitation technique can involve complex interfacial hydrodynamic phenomena since the origin of the PN formation mechanism could be explained in terms of interface turbulence or spontaneous agitation of the interface between two unbalanced liquid phases, which involve flow, diffusion and surface processes [16]. This process, in which the rapid formation of PN is caused, is linked to the Marangoni effect, which establishes that the turbulences that occur at the interface between the solvent and the non-solvent are due to various accumulated phenomena that include diffusion variations, movement at an interface and longitudinal variations in interfacial tension [17]. Interfacial turbulence can be promoted by several factors that, although identified, have not been widely described [18].

This study evaluated the influence of the main variables of the nanoprecipitation method on particle size and degree of homogeneity in size (Polydispersity Index, PDI) in the preparation of nanoparticles based on preformed polymers derived from methacrylic acid (Eudragit®). As observed in Fig. 3a, where the OP increases were related to the decrease in particle size, and then had little or no influence. As the amount of polymer was kept constant, this produced a decrease in concentration. When this solution is injected into the AP, after the solvent diffuses, tiny droplets are formed that finally lead to the formation of PN. This decrease in size may be because each drop

formed in dilute solutions presented fewer polymer chains for particle formation. However, it is observed that these variable stops influencing when the OP volume increases, that is, with slightly more diluted solutions, the sizes obtained even significantly increases ($p \leq 0.05$). This implies that the sizes of the droplets formed must have increased. The droplet sizes are directly related to the ease of diffusion of the OP in the AP. Because diffusion is a phenomenon related to the concentration gradient, AP and OP meet at the beginning of the process, allowing easy diffusion, but as the process progresses, the amount of OP present in the AP increases, leading to a lower concentration gradient of the OP molecules, leading to less efficient diffusion that will possibly form larger droplets. In Fig. 4a, it is shown that with the increases in the volume of OP tested in three polymers, they showed an increase in the PDI for higher volumes, possibly due to the fact that diffusion has been hindered as mentioned, which possibly increases turbulences in the system.

When the PA volume is varied (Fig. 3b), it was observed that only in the first increments of this variable, the particle size decreases. Particle sizes produced by emulsion-based, or pseudo-emulsion-based methods such as nanoprecipitation, are directly related to droplet size [19]. Thus, it is possible that the increase in AP volume led to a decrease in droplet size, possibly because diffusion is slightly facilitated longer because of the concentration gradient, which normally decreases as OP it is incorporated into the AP, because there is a higher volume of AP, which translates into a dilution of the OP in the AP. It can also be seen that for the volumes tested for three of the polymers, the influence of this variable quickly ended, indicating that possibly the volume portion of the diffusion zone (Marangoni effect zone) presents a defined volume for each system at disseminate and cannot be expanded despite having more AP [17].

On the other hand, the influence of this variable on the homogeneity of the particle size is not very clear.

When evaluating the amount of polymer (Fig. 3c) polymers tend to form larger particles as the PA increases. This behavior indicates that the small droplets formed during the turbulence given by the diffusion of the OP in the AP maintain a greater number of polymer chains than the particles formed possibly have a greater mass and therefore a larger size. In fig. 4c there is no clear trend between the increase in the amount of polymer used and the homogeneity of the size. This shows that this variable does not present such a great influence that it exceeds the combinations of the implicit phenomena during the formation of the NP, which allows a priori to suggest conditions to obtain a homogeneous size. On the contrary, it seems to indicate that the changes caused by increases in the amount of polymer mass (PA), are unique to each system to be disseminated.

In relation to the polymer used, we can distinguish that two structurally related groups were tested (Fig. 2). One group would be those made up of the Eudragit® E100 and EPO polymers that have the same monomer and with molecular weights around 47,000 g/mol, and the other, the one formed by the structurally very similar L100 and L00-55 polymers with molecular weights of approximately 125,000 g/mol [6, 20]. The behavior of these materials in the different variables tested showed indeed a similar performance per polymer group. Regardless of the variable analyzed, the Eudragit® E100 and EPO polymers formed the largest particles. This indicates that the molecular size is not the main factor as these polymers have lower molecular weight than the L100 and L00-55 polymers. Nevertheless, their polymeric chains have larger ramifications, resulting in a greater steric effect when compacted by aggregation during nanoparticle

formation [21]. The challenge of nanoprecipitation is the choice of key parameters or variables for the system to allow a functional diffusion zone generally called the Ouzo region, in which nanoparticles will form and which other authors have also identified [22]. However, successful PN production is restricted to a close condition of the Ouzo region, beyond which microparticles or polymer aggregates are produced [23].

There are some examples described in the literature where the basic parameters are sufficient for the preparation of particles with desired characteristics [24]. However, there are situations where these variables are not sufficient to have this functional diffusion zone. In addition to the critical variables, the authors have had to increase the study of other parameters, for example, the preparation of docetaxel-charged PN, which were achieved by modifying the polymer [25]. Another example is found in the encapsulation of procaine hydrochloride, where the diffusion of the drug was decreased [26]. Although nanoprecipitation remains the first choice particle preparation technique for its simplicity, research in the literature shows that it is not exempt from evaluations of its critical parameters, as these are linked to the diffusion zone and which is not yet exhausted in such studies [27].

For a pharmaceutical drug to be useful, it must possess bioactive properties and exhibit a non-cytotoxic profile [28]. Erythrocytes have been used as a model system by several researchers to determine the interaction of drugs with mammalian membranes, the erythrocyte model has been commonly used in the elaboration of toxicity profiles since it provides a direct indication of the toxicity of formulated either injectable or administered by another route such as oral [29]. Hemolysis is the result of the destruction of the erythrocyte caused by lysis of the lipid bilayer of the membrane, the lysis of erythrocytes can cause anemia, an increase in plasma hemoglobin that causes

nephrotoxicity and vasomotor instability [30]. In a hemolytic assay, carried out with a suspension of erythrocytes and Drabkin's reagent, which is used for the quantitative colorimetric determination of blood hemoglobin, Fe^{2+} of hemoglobin molecules was oxidized by potassium ferricyanide to Fe^{3+} , this, resulted in the formation of methemoglobin which combined with the cyanide ions to form cyanometahemoglobin, a stable compound color pigment that is read calorimetrically at 590 nm [31]. The four polymers did not show significant ($p \leq 0.001$) cytotoxicity, the hemolytic activity was less than 0.1% (Table 1) in all the formulations. Therefore, the hemolytic activity less than 1% obtained for the four polymers is an indicator of non-toxicity for the red cell membrane, which therefore favors the subsequent study with these polymers.

5 Conclusion

The results of the nanoparticle formation of Eudragit[®] polymers by the solvent displacement technique confirmed that size and homogeneity are directly related to the fundamental variables of the technique. This comparative study allows to choose the right combination for the formulation of NP with a defined particle size in the range of 70 to 230 nm in a simple way and to reproduce it, through polymers derived from methacrylic acid with populations of particles with a high homogeneity size.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors report no conflicts of interest.

Ethical statement All procedures were approved by the institutional research ethics committee and performed in accordance with the recommendations of the Declaration

of Helsinki on biomedical research involving human subjects. The study with human erythrocytes was carried out under the approval of the ethics committee of the Autonomous University of Nuevo León., College of Medicine (Reg.No.HI11002) and the consent of healthy donors, following the provisions of the Official Mexican Technical Standard NOM-253-SSA1-2012

References

1. Chan H-K (2011) Nanodrug particles and nanoformulations for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 63:405. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2011.05.006>
2. Lee BK, Yun Y, Park K (2016) PLA micro- and nano-particles. *Adv Drug Deliv Rev* 107:176–191. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.020>
3. Caddeo C, Gabriele M, Fernández-Busquets X, et al (2019) Antioxidant activity of quercetin in Eudragit-coated liposomes for intestinal delivery. *Int J Pharm* 565:64–69. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2019.05.007>
4. Asimuddin M, Shaik MR, Adil SF, et al (2020) Azadirachta indica based biosynthesis of silver nanoparticles and evaluation of their antibacterial and cytotoxic effects. *J King Saud Univ - Sci* 32:648–656. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.09.014>
5. Cetin M, Atila A, Kadioglu Y (2010) Formulation and In vitro Characterization of Eudragit® L100 and Eudragit® L100-PLGA Nanoparticles Containing Diclofenac Sodium. *AAPS PharmSciTech* 11:1250–1256. <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9489-6>
6. Patra CN, Priya R, Swain S, et al (2017) Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. *Futur J Pharm Sci* 3:33–45. <https://doi.org/10.1016/j.fjps.2017.02.001>

- 356 7. Dawodu FA, Onuh CU, Akpomie KG, Unuabonah EI (2019) Synthesis of silver
357 nanoparticle from *Vigna unguiculata* stem as adsorbent for malachite green in a
358 batch system. *SN Appl Sci* 1:1–10. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0353-3>
- 359 8. Vauthier C, Bouchemal K (2009) Methods for the Preparation and Manufacture
360 of Polymeric Nanoparticles. *Pharm Res* 26:1025–1058.
361 <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9800-3>
- 362 9. Date AA, Jain A, Khachane P, Nagarsenker MS (2010) Organic solvent-free
363 approach to single step fabrication of Eudragit nanoparticles using Labrasol.
364 *Pharmazie* 65:733–736. <https://doi.org/10.1691/ph.2010.0063>
- 365 10. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, et al (1989) Nanocapsule formation by
366 interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm* 55:1–
367 4. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0)
- 368 11. Maharjan P, Jin M, Kim D, et al (2019) Evaluation of epithelial transport and
369 oxidative stress protection of nanoengineered curcumin derivative-cyclodextrin
370 formulation for ocular delivery. *Arch Pharm Res* 42:909–925.
371 <https://doi.org/10.1007/s12272-019-01154-9>
- 372 12. Elizondo-Luevano JH, Verde-Star J, González-Horta A, et al (2020) In Vitro
373 Effect of Methanolic Extract of *Argemone mexicana* against *Trichomonas*
374 *vaginalis* . *Korean J Parasitol* 58:135–145.
375 <https://doi.org/10.3347/kjp.2020.58.2.135>
- 376 13. Lakshmi G, Smitha N, Ammu S V., et al (2014) Phytochemical profile, in vitro
377 antioxidant and hemolytic activities of various leaf extract of *Nymphaea*
378 *Nouchali* Linn: An in vitro study. *Int J Pharm Pharm Sci* 6:548–552
- 379 14. Urbán-morlán Z, Mendoza-elvira SE, Hernández-cerón RS, et al (2015)

Preparation of Ethyl Cellulose Nanoparticles by Solvent-Displacement Using the
Conventional Method and a Recirculation System. 59:173–180

15. Bilati U, Allémann E, Doelker E (2005) Development of a nanoprecipitation
method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. Eur J
Pharm Sci 24:67–75. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2004.09.011>

16. D’Addio SM, Prud’homme RK (2011) Controlling drug nanoparticle formation
by rapid precipitation. Adv Drug Deliv Rev 63:417–426.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.04.005>

17. Wang Y, Li P, Tran TT, et al (2016) Manufacturing Techniques and Surface
Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to
Cancer Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based
Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer.
<https://doi.org/10.3390/nano6020026>

18. Das S, Suresh PK, Desmukh R (2010) Design of Eudragit RL 100 nanoparticles
by nanoprecipitation method for ocular drug delivery. Nanomedicine
Nanotechnology, Biol Med 6:318–323.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.09.002>

19. Shrimal P, Jadeja G, Patel S (2020) A review on novel methodologies for drug
nanoparticle preparation: Microfluidic approach. Chem Eng Res Des 153:728–
756. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.11.031>

20. Ji Y, Lemberg M, Prudic A, et al (2017) Modeling and analysis of dissolution of
paracetamol/Eudragit® formulations. Chem Eng Res Des 121:22–31.
<https://doi.org/10.1016/j.cherd.2017.03.007>

21. Dillen K, Vandervoort J, Van den Mooter G, Ludwig A (2006) Evaluation of

- 404 ciprofloxacin-loaded Eudragit® RS100 or RL100/PLGA nanoparticles. Int J
405 Pharm 314:72–82. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2006.01.041>
- 406 22. Beck-Broichsitter M, Rytting E, Lehardt T, et al (2010) Preparation of
407 nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: A shift in the “ ouzo
408 region” upon drug loading. Eur J Pharm Sci 41:244–253.
409 <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.06.007>
- 410 23. Beck-broichsitter M, Rytting E, Lehardt T, et al (2010) European Journal of
411 Pharmaceutical Sciences Preparation of nanoparticles by solvent displacement for
412 drug delivery : A shift in the “ ouzo region ” upon drug loading. Eur J Pharm Sci
413 41:244–253. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.06.007>
- 414 24. Budhian A, Siegel SJ, Winey KI (2007) Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles:
415 Systematic study of particle size and drug content. Int J Pharm 336:367–375.
416 <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2006.11.061>
- 417 25. Lu Y, Sturek M, Park K (2014) Microparticles produced by the hydrogel
418 template method for sustained drug delivery. Int J Pharm 461:258–269.
419 <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2013.11.058>
- 420 26. Govender T, Stolnik S, Garnett MC, et al (1999) PLGA nanoparticles prepared
421 by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. J
422 Control Release 57:171–185. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(98\)00116-3](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00116-3)
- 423 27. Rathod L V., Kapadia R, Sawant KK (2017) A novel nanoparticles impregnated
424 ocular insert for enhanced bioavailability to posterior segment of eye: In vitro, in
425 vivo and stability studies. Mater Sci Eng C 71:529–540.
426 <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.017>
- 427 28. Kurapov YA, Vazhnichaya EM, Litvin SE, et al (2019) Physical synthesis of iron

oxide nanoparticles and their biological activity in vivo. SN Appl Sci 1:1–11.

<https://doi.org/10.1007/s42452-018-0110-z>

29. Mombeshora M, Mukanganyama S (2019) Antibacterial activities , proposed mode of action and cytotoxicity of leaf extracts from *Triumfetta welwitschii* against *Pseudomonas aeruginosa*. 1–12
30. Kalegaril M, Miguel MD, Dias J de FG, et al (2011) Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch. (Connaraceae). Brazilian J Pharm Sci 47:635–642.
<https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000300023>
31. Acker JP, M. Croteau I, Yi Q-L (2012) An analysis of the bias in red blood cell hemolysis measurement using several analytical approaches. Clin Chim Acta 413:1746–1752. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2012.06.028>

Table 1. Cytotoxic activity by different Eudragit® polymers at different concentrations

$\mu\text{g/mL}$	POLYMERS			
	EPO	E100	L100	L100-55
C+	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0
100	0.013 \pm 0.002 ^a	0.013 \pm 0.004 ^a	0.029 \pm 0.007 ^a	0.012 \pm 0.002 ^a
200	0.016 \pm 0.002 ^{ab}	0.014 \pm 0.002 ^a	0.041 \pm 0.012 ^b	0.016 \pm 0.002 ^a
400	0.018 \pm 0.001 ^{ab}	0.017 \pm 0.002 ^a	0.042 \pm 0.010 ^b	0.017 \pm 0.004 ^a
600	0.019 \pm 0.002 ^{ab}	0.017 \pm 0.003 ^a	0.043 \pm 0.007 ^b	0.019 \pm 0.001 ^a
800	0.020 \pm 0.004 ^{ab}	0.018 \pm 0.001 ^a	0.045 \pm 0.005 ^b	0.020 \pm 0.009 ^{ab}
1,000	0.025 \pm 0.003 ^b	0.021 \pm 0.005 ^{ab}	0.048 \pm 0.005 ^b	0.023 \pm 0.006 ^{ab}
SE	0.002	0.001	0.003	0.002
<i>p</i> ANOVA	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
<i>F</i> ANOVA	17.235	8.795	4.387	0.933

Values are shown as the mean \pm SD (n=3) ($p < 0.05$) of the % of cytotoxicity, and the standard error (SE). Different letters within the same column are significantly different analyzed via the Tukey test.

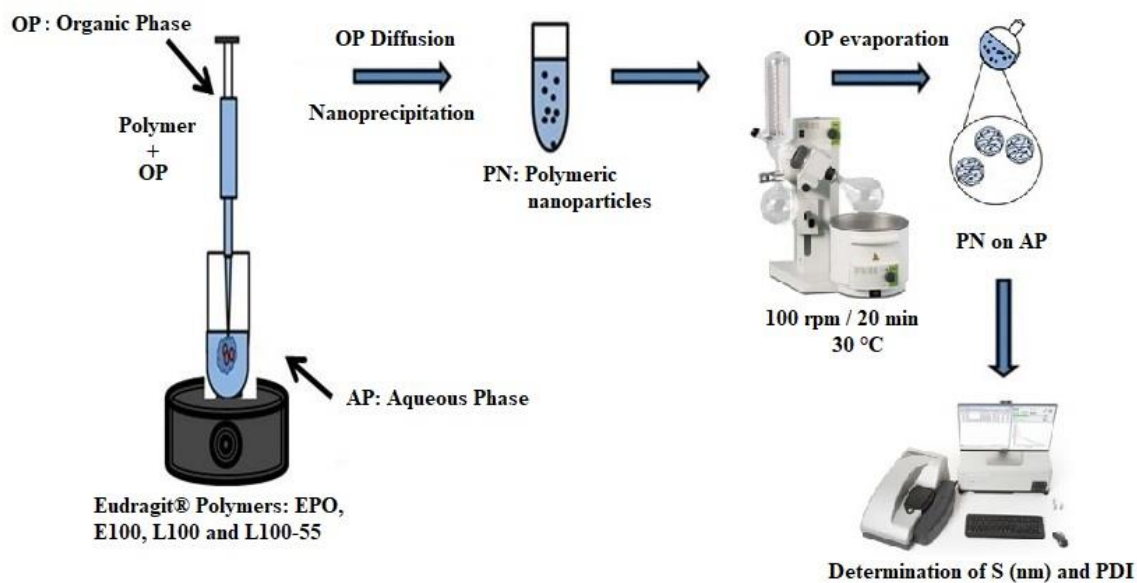
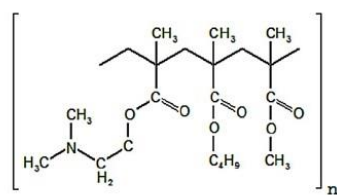
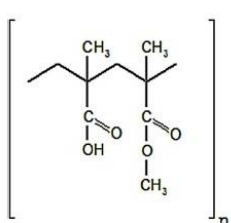


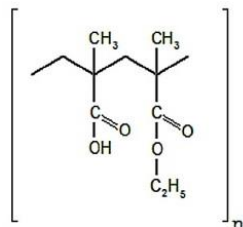
Fig. 1. Diagram of the nanoprecipitation technique. OP: organic phase, AP: aqueous phase, PN: polymeric nanoparticles, PDI: Polydispersity, S: Size.



(a)



(b)



(c)

Fig. 2. Chemical structures of Eudragit[®] polymers: **a)**: EPO, **b)**: E100, **c)**: L100 and **d)**: L100-55. [6, 20].

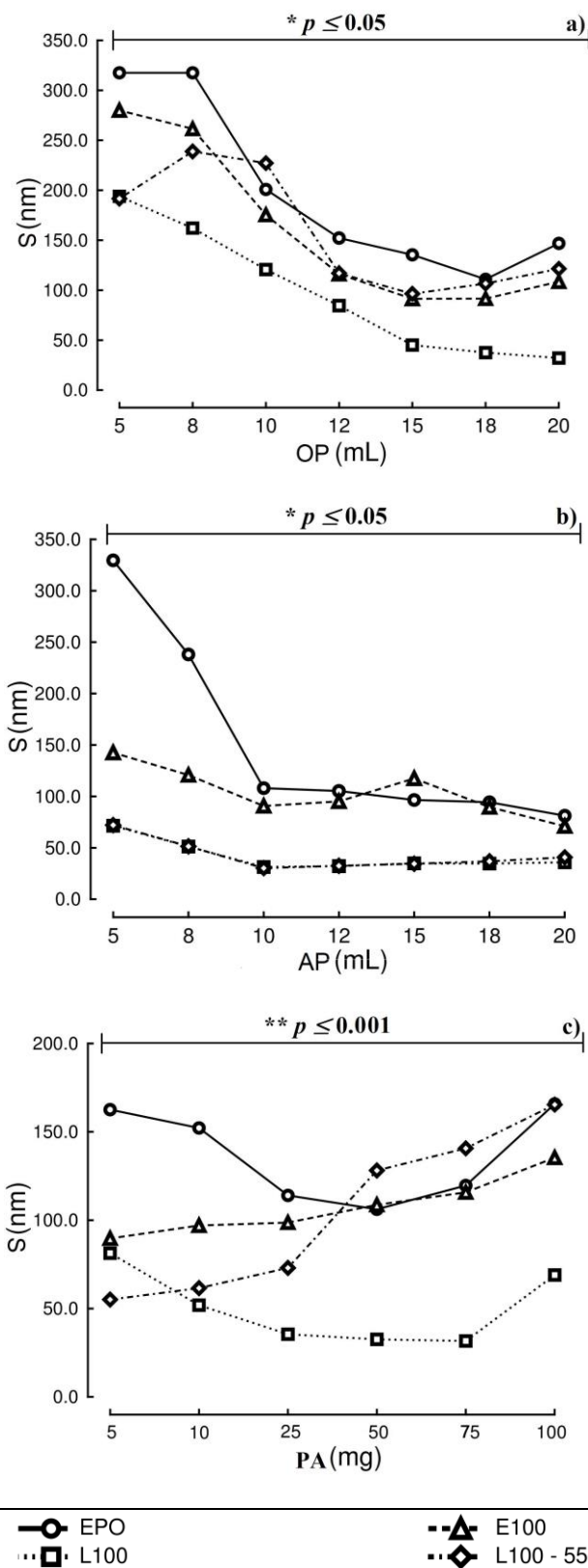


Fig. 3. Effect on S (nm), in the different formulations. **a).** Effect of OP volume on S (50 mg MP + 12 mL AP). **b).** Effect of AP volume on S (50 mg PA + 12 mL OP). **c).** Effect

502 of PA on S (12 mL + OP 12 mL AP). OP: organic phase, AP: aqueous phase, PA:
503 polymer amount. Each point represents the mean of 3 different experiments (n = 6).
504 *Significant difference: $p \leq 0.05$. **Highly significant difference: $p \leq 0.001$.

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

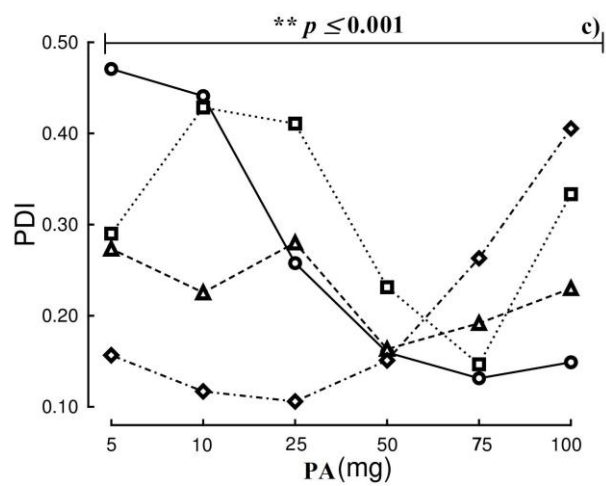
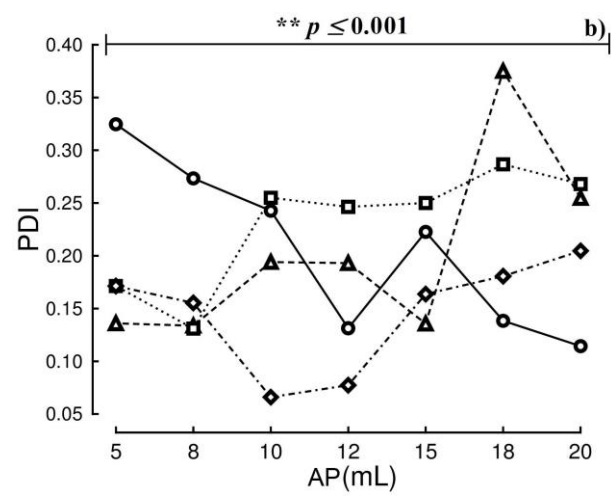
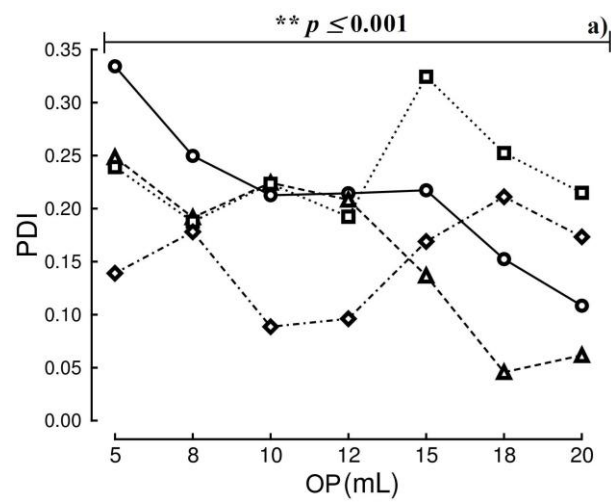
516

517

518

519

520



—○— EPO - - -△- - - E100
 ...□... L100 - · -◇- · - L100 - 55

522 **Fig. 4.** Effect on the PDI, in the different formulations. **a).** Effect of OP volume on S
523 (50 mg MP + 12 mL AP). **b).** Effect of AP volume on S (50 mg PA + 12 mL OP). **c).**
524 Effect of PA on S (12 mL + OP 12 mL AP). OP: organic phase, AP: aqueous phase, PA:
525 polymer amount. Each point represents the mean of 3 different experiments (n = 6).
526 *Significant difference: $p \leq 0.05$. **Highly significant difference: $p \leq 0.001$.

527